



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACION DE LA EXPRESION MORFOGENETICA
in vitro DE UN ARBOL MADERABLE DE INTERES
ECONOMICO (*Cedrela odorata*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

T E R E S A R U I Z O L V E R A

DIRECTORA DE TESIS: ING. MA. TERESA OLIVERA FLORES



MEXICO, D.F.



2000

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

281312



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

ESTAMPADO DE FONDO
1973 JUN 21 11:43

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN MORFOGENÉTICA in vitro DE UN ÁRBOL MADERABLE DE INTERÉS ECONÓMICO (Cedrela odorata)

realizado por Teresa Ruiz Olvera

con número de cuenta 8922062-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Ing. Ma. Teresa Olivera Flores

Teresa Olivera Flores

Propietario

M. en C. Aurora Zlotnik Espinosa

Aurora Zlotnik

Propietario

M. en C. Ma. Guadalupe Barajas Guzmán

Ma. Guadalupe Barajas Guzmán

Suplente

M. en C. Mabel Hernández Altamirano

Mabel Hernández Altamirano

Suplente

Biol. Josefina Herrera Santoyo

FACULTAD DE CIENCIAS
U N . A . M .

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Estar loco se dice que es haber perdido la razón. La razón, pero no la verdad, porque hay locos que dicen las verdades que los demás callan, por no ser ni racional ni razonable decirlas, y por eso se dice que están locos. ¿Y qué es la razón?.

La razón es aquello en que estamos todos de acuerdo, todos o por lo menos la mayoría. La verdad es otra cosa, la razón es social; la verdad, de ordinario, es completamente individual, personal e incommunicable. La razón nos une y las verdades nos separan.

Mas puedo caer en la cuenta de que acaso es la verdad la que nos une y son las razones las que nos separan, y de que toda esta turbia filosofía sobre la razón, la verdad y la locura obedece a un estado de ánimo o a un estado mental...tal vez sea locura.

M. Unamuno

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis padres y a mis hermanos, quienes con su amor y entrega desinteresada me han formado, porque de no haber estado a mi lado, la madeja de mis pensamientos seguiria enrollada en un núcleo estéril.

Al equipo del laboratorio 116, principalmente a Félix por los momentos tan agradables que me hizo pasar y que aligeraron los momentos de trabajo, a la señora Alicia, por su gran afecto y a todos mis compañeros: Gina, Guadalupe, Marina, Victor, Ana Lilia, Karina, Laura e Israel por su ayuda, amistad y enseñanzas.

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias: Paula, David, Pancho, Juana N., Jesús, Alvaro, Gabriel, Rafael Roldán, Roberto, Jaina, Gabriela, Angélica, Rosalba, Rafa y Toño, porque con ellos compartí momentos de gran inquietud y esperanza.

A mis compañeros de Universum: Ana Lilia, Verónica, Elizabeth, Pinachos, Javier, Miguel, Morato, Lubansky, Rosalinda, Alejandro, Gabriela, Lalo, Haide, Mario, Zenet, Toño, Xochitl, Gamaliel y Alejandro I., porque a pesar de nuestras diferencias ideológicas, emprendimos juntos algo, que aunque no tuvo un fin común, nuestros rumbos indican que la intención fue siempre la misma... buscar nuestra libertad, para intentar liberar a otros.

A Verónica Rivera y a Fabiola, quienes durante años han sabido alentar mi espíritu con actitudes fraternales.

A Clariza y a Pavel, porque no tuvo que pasar mucho tiempo, para que mi cariño y confianza estuvieran de su lado.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio 116 de Cultivo de Tejidos Vegetales del departamento de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Química

A Mayte por su tiempo, dedicación y asesoría técnica brindada durante la realización de este trabajo.

A Aurora Zlotnik, por haber sido tan buena profesora, y porque con paciencia me alentó para finalizar este proyecto.

A Guadalupe Barajas porque sus observaciones fueron enriquecedoras y acertadas.

A Mabel Hernández por su confianza y sencillez mostradas en todo momento.

A Josefina Herrera por su incondicional apoyo y amistad brindada.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. OBJETIVOS.....	5
III. HIPOTESIS.....	5
IV. ANTECEDENTES.....	6
A) Producción forestal maderable en México.....	6
B) Problemática.....	7
C) Propagación vegetativa.....	9
a) Macropropagación.....	10
b) Micropropagación: Cultivo de Tejidos.....	11
i) Organogénesis.....	11
ii) Embriogénesis.....	12
D) Propagación <i>in vitro</i> de especies forestales.....	13
E) Medio de cultivo.....	15
a) Macroelementos.....	15
b) Microelementos.....	17
c) Vitaminas.....	18
d) Fuente de carbono.....	19
e) Antioxidantes.....	20
f) Reguladores de crecimiento.....	20
F) Generalidades de <i>Cedrela odorata</i>	21
G) Descripción botánica.....	22
H) Principales productos y utilización de <i>Cedrela odorata</i>	22
I) Propagación de <i>Cedrela odorata</i>	22

V. MATERIAL Y MÉTODOS	24
A) Procedencia del material a utilizar.....	24
B) Desinfección del material.....	24
C) Medio utilizado.....	25
D) Manejo de los explantes.....	25
E) Incubación de los explantes.....	25
F) Tratamientos y diseño experimental.....	26
G) Análisis de resultados.....	26
a) Etapa I. Método de esterilización.....	28
b) Etapa II. Selección del medio básico.....	29
c) Etapa III. Determinación de las combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento, fuente de carbono y antioxidante.....	31
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
A) Etapa I. Método de esterilización.....	36
B) Etapa II. Selección del explante y medio básico.....	37
C) Etapa III. Determinación de las combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento, fuente de carbono y antioxidante.....	42
VII. CONCLUSIONES	52
VIII. RECOMENDACIONES	53
IX. BIBLIOGRAFÍA CITADA	54
ANEXOS	58

RESUMEN

Cedrela odorata L. (cedro rojo) es una de las principales especies forestales que en nuestro país es explotada por su madera, sin embargo, ésta como otras especies forestales tropicales han presentado dificultad en su propagación tradicional ya que presentan ciclo de vida largo y semillas recalcitrantes.

La micropropagación representa una alternativa para generar un gran número de plantas en poco tiempo, con las cuales pudieran iniciarse plantaciones que a largo plazo recuperen áreas deforestadas.

El objetivo central de este trabajo fue regular la expresión morfogénica de *Cedrela odorata* a través de combinaciones y concentraciones de los componentes del medio, tanto en su parte inorgánica como en la orgánica, estableciendo en principio, las condiciones asépticas adecuadas para la siembra de los explantes, los cuales dieron una respuesta consecuente a dicha regulación, manifestándose en la diferenciación y desarrollo de brotes adventicios.

Los medios probados fueron el de Murashige y Skoog (1962) y el de Heller (1953), los cuales se suplementaron con distintas concentraciones y combinaciones de AIA, AIB y ANA como auxinas, BAP y Zip como citocininas y la giberelina AG₃. Además se buscó disminuir la oxidación adicionando pirogalol mas ácido ascórbico, y promover la diferenciación y crecimiento de brotes modificando la fuente de carbono.

ABREVIATURAS

AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indolbutírico
AG ₃	Ácido giberélico
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6-bencilaminopurina o benciladenina
2ip	2-isopentiladenina o 6-(γ,γ -dimetilamino) purina
Kgcm ⁻²	Kilogramos por centímetro cuadrado
M	Molar
MS	Medio de Murashige y Skoog (1962)
mgL ⁻¹	Miligramos por litro
mM	Milimolar
msnm	Metros sobre el nivel del mar
$\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	MicroEinsteins por metro cuadrado por segundo
μM	Micromolar
N	Normal

I. INTRODUCCIÓN.

Las plantas tienen la capacidad de reproducirse tanto sexual como asexualmente, ésta última forma depende en gran medida del potencial de las células vegetales para producir una réplica de la planta original con el mismo genotipo. Dicha réplica recibe el nombre de clon; bajo este principio se realiza la técnica de micropropagación o cultivo de tejidos vegetales (Hocker, 1984; Huang, 1993).

El término de cultivo de tejidos, o cultivo *in vitro*, se define como el proceso de reproducción asexual usando técnicas artificiales, en donde el tejido o explante se desarrolla bajo condiciones asépticas y factores ambientales controlados como la luz y la temperatura, y de balances nutricionales que promuevan la morfogénesis de los explantes, proceso basado en el fenómeno de la "totipotencia" de las células (Aitken-Christie *et al.*, 1981; Villalobos y Thorpe, 1985).

El empleo de la micropropagación ha ido en aumento en gran diversidad de especies para resolver problemas prácticos en la agricultura, medicina e industria (principalmente en árboles que proporcionan madera); esto incluye la producción de productos naturales, y la multiplicación clonal rápida de genotipos selectos. Las ventajas que muestra esta técnica respecto a otros sistemas de propagación, se pueden resumir en seis puntos importantes: 1) con una pequeña cantidad de tejido (llamado explante) potencialmente se pueden generar un gran número de plantas; 2) esta técnica representa una opción para la multiplicación de especies con dificultades para ser propagadas por métodos convencionales; 3) el número de plantas derivadas por genotipo se puede incrementar rápidamente y en tiempos más cortos; 4) se pueden multiplicar grandes cantidades de plantas en espacios reducidos y a bajos costos; 5) se puede controlar la sanidad del material propagado y 6) los materiales se pueden transportar bajo las condiciones *in vitro* hacia otros países con menos restricciones (Estrada, 1988).

Es fácil comprender el interés en propagar clonalmente especies arbóreas, si se toma en cuenta lo largo que son los ciclos desde la siembra de las semillas hasta la floración. Más aún, estos largos períodos han hecho muy difícil la aplicación de la genética convencional en el mejoramiento de estas especies.

Desde hace varios años, se han venido realizando diversas investigaciones sobre el establecimiento y manejo de plantaciones, con el objeto de generar los conocimientos y técnicas necesarias para el cultivo de especies forestales con interés económico. El cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) es un árbol que ha mostrado su potencial como fuente de madera para la industria forestal. Precisamente por lo anterior, es que al realizar un cultivo *in vitro* se pueden obtener un gran número de plantas en menor tiempo sin partir de semillas, anulando la probabilidad de no germinación en medios naturales, por las condiciones del suelo o inviabilidad de la misma semilla. De tal modo, la técnica de cultivo *in vitro* representaría una gran opción para propagar un gran número de plantas con las que se inicien plantaciones (Patiño, *et al.*, 1997).

Debido a la importancia económica que tiene el cultivo de especies forestales, y dado que su propagación tradicional es limitada, el presente trabajo pretende ser el inicio de un proyecto interdisciplinario que busca alternativas en la propagación de especies de maderas finas.

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar un medio de cultivo que genere el mayor número de estructuras diferenciadas (brotes adventicios de *Cedrela odorata*) a partir de hojas y yemas apicales y adventicias utilizadas como explante, obtenidas de árboles jóvenes de cedro rojo.

Objetivos particulares:

- Determinar el método de esterilización para el cultivo *in vitro* de *Cedrela odorata* L.
- Seleccionar el explante más adecuado para la expresión morfogénica *in vitro*
- Definir la composición del medio básico para el establecimiento de los explantes
- Determinar la composición de la parte orgánica del medio para la generación de estructuras diferenciadas

III. HIPOTESIS

Si la respuesta morfogénica de la planta está modulada por el ambiente, entonces dicha respuesta en cultivos *in vitro* de yemas y hojas se regulará por la composición orgánica e inorgánica del medio, estimulando la diferenciación de brotes adventicios.

IV. ANTECEDENTES

A) Producción forestal maderable en México

La producción forestal maderable de México es de 13.5 millones de metros cúbicos rollo, y se obtiene fundamentalmente de tres regiones: Sierra Madre Occidental (Chihuahua y Durango), Sierra Madre del Sur (Oaxaca y Jalisco) y en el estado de Veracruz; de estas entidades, Durango es el mayor productor con 2.2 millones de metros cúbicos rollo (INEGI, 1997).

De la producción total maderable en Durango, el 92% corresponde a especies del género *Pinus*, ya que México posee el mayor número de especies en el mundo, el 6.7% a madera de encino y el 1.3% restante a madera de oyamel y otras especies (INEGI, 1997).

Existen otras especies maderables que se encuentran tanto en bosques de clima templado-frío como en selvas de zonas cálido-húmedas. Para el primer caso, se pueden mencionar algunos géneros con importancia económica: cedro blanco (*Cupressus*), aile (*Alnus*) y enebro (*Juniperus*), en el segundo caso, se distinguen los siguientes géneros: ébano (*Pithecellobium*), pukté (*Bucida*), cedro rojo (*Cedrela*), caoba (*Swietenia*), y chechem (*Metopium*). En ese sentido, Veracruz ocupa el primer lugar en la producción maderable de otras especies con 750 mil metros cúbicos, Guerrero se encuentra en segunda posición con 440 mil metros cúbicos y Campeche se ubica en tercera posición con 390 mil metros cúbicos (INEGI, 1995).

Específicamente, en las zonas cálido-húmedas de México se encuentran comunidades vegetales muy densas, con gran cantidad de especies arbóreas, abundantes bejucos y plantas trepadoras. De acuerdo a la altura de los árboles dominantes y al carácter perennifolio o caducifolio de los mismos, las selvas del país se agrupan, de manera general, en los siguientes tipos: selva alta perennifolia, selva alta o mediana subperennifolia, selva mediana subperennifolia, selva mediana subcaducifolia, selva caducifolia y manglar (Rzedowski, 1984).

El aprovechamiento y uso de la gran diversidad de maderas provenientes de especies de árboles tropicales ha sido una de las actividades más importantes en la economía de la zona cálido-húmeda del país, particularmente en la del sureste de México. Las especies económicamente más importantes son caoba, cedro, chacáh, chechem, chicozapote, ébano, guanacaste, mangle y pukté. El total de estas especies para la República Mexicana fue de 580 mil metros cúbicos, según el último reporte del INEGI (1997).

Cedrela odorata produce madera en un total de 60 mil metros cúbicos siendo Veracruz la entidad que ocupa el primer lugar a escala nacional con 17 mil metros cúbicos. Los estados que le siguen son Tabasco, Quintana Roo y Puebla. La producción forestal se lleva a cabo principalmente en terrenos ejidales (72.3%), con los terrenos privados en segundo lugar (25.4%) y los de unidades mixtas (2.2%). La producción forestal maderable de la República Mexicana se destina en gran parte (31.2%) al uso integral (aserrío, postería, leña y carbón) (INEGI, 1995).

B) Problemática

La tasa de deforestación se ha acelerado en las últimas décadas, en especial en los ecosistemas forestales tropicales. La deforestación, en la actualidad es uno de los problemas de mayor interés y preocupación general, por las repercusiones negativas que ocasiona sobre otros recursos y por su contribución al deterioro ambiental. Sin embargo, la eliminación de la vegetación no es un fenómeno reciente; de hecho, esta actividad ha acompañado siempre al desarrollo de las sociedades humanas (Vargas y Velázquez, 1992).

Los bosques tropicales cubren alrededor de 800 millones de hectáreas, lo que equivale entre 35% y 45% de toda la superficie forestal del planeta y es en Latinoamérica en donde se presentan las tasas de deforestación más elevadas (Capó y Sánchez, 1992).

Se consideró durante mucho tiempo a las explotaciones forestales comerciales como el principal factor de deforestación; sin embargo, en la actualidad la situación ha cambiado en forma considerable. Datos de la FAO indican que más del 80% de la madera extraída de los bosques se utiliza como combustible en las áreas rurales (Capó y Sánchez, 1992).

Diferentes autores coinciden en señalar a la transformación de terrenos forestales en zonas de cultivos agrícolas o de pastizales como los principales agentes de deforestación, en particular de regiones tropicales.

Determinar las causas que motivan la acción de los agentes de deforestación es mucho más complicado por las interacciones que se dan entre ellas. En primera instancia se encuentran las causas obvias, como el creciente aumento de la población humana, asociado con un aumento en la demanda de alimentos y de bienes y servicios derivados, finalmente la explotación irracional de los productores de madera han acelerado la deforestación en el planeta (Capó y Sánchez, 1992).

Es evidente que se debe tener conocimiento acerca de las implicaciones ecológicas y ambientales a las que nos lleva la deforestación por derribo de árboles maderables. Los derribos dañan las copas y fustes de los árboles vecinos, así como aquellos en regeneración avanzada. El grado de daño depende del tamaño y número de árboles derribados por unidad de área. Los individuos en regeneración avanzada son los más afectados retrasándose así la sucesión y la recuperación de masa. Otros aspectos que deben considerarse ligados a la explotación forestal son: pérdida de la productividad de suelo, azolvamiento de cauces, lagos, presas y otros cuerpos de agua, proliferación de plagas y enfermedades (Capó y Sánchez, 1992).

Una alternativa para los problemas anteriormente expuestos es la restauración de zonas deforestadas, el mejoramiento genético, así como la selección de especies a plantar. Para reforzar trabajos sobre plantaciones forestales hacen falta métodos de genética forestal. Al establecer una plantación uno de los problemas es que no se cuenta con el germoplasma certificado y adecuado para producir la planta que satisfaga el objetivo (Jasso y López, 1992).

C) Propagación vegetativa

La demanda mundial de productos forestales se incrementa día a día, ya sea por productos maderables, industria química y del papel, así como las necesidades de reforestación y la utilización potencial de derivados vegetales para la producción de energético. Ante este panorama de creciente demanda de productos comerciales es necesario producir árboles que respondan a estas necesidades. Esto significa plantar árboles de ciclo corto, con madera de buena calidad, troncos uniformes, rápido crecimiento, etc. y por otro lado, aplicar un sistema que permita la multiplicación masiva de individuos con características deseadas.

El mejoramiento genético de especies forestales no ha sido tan rápido como el de los cultivos agrícolas. El largo período de crecimiento desde la siembra de la semilla hasta la floración, es uno de los grandes obstáculos para el mejoramiento genético de manera tradicional, ya que significaría un largo tiempo. Ante este panorama los métodos de propagación vegetativa representan una posible solución a este tipo de problemas, incluso esta técnica de propagación se ha convertido en cierta forma en rutina para ciertas especies de pinos tales como *P. taeda*, *P. virginiana* y *P. radiata* (Aimers-Halliday, 1992).

Básicamente al hacer propagación vegetativa se está imitando un proceso que de manera natural ocurre en la naturaleza, con la diferencia que en el laboratorio es posible modificar y acelerar el proceso de clonación.

La propagación vegetativa (reproducción asexual) de especies forestales contribuye en gran medida a la domesticación y mejoramiento de especies. Algunos de los aspectos que apoyan esto son:

1. La propagación vegetativa tiene el potencial para incrementar el rendimiento de una generación durante un programa de mejoramiento.
2. Se pueden seleccionar y multiplicar caracteres derivados de genes con acción aditiva y no aditiva.
3. Los clones seleccionados se pueden mantener como bancos de germoplasma para posteriormente obtener nuevos materiales genéticos mediante polinización controlada.
4. Los clones seleccionados se pueden emplear en plantaciones comerciales.

5. Los progenitores genéticamente uniformes se pueden multiplicar en gran escala.
6. El tiempo desde la siembra, hasta el corte de árboles se reduce hasta año y medio (aproximadamente) con propagación clonal (Villalobos *et al.*, 1983; Vargas *et al.*, 1997).

a) Macropropagación

La propagación vegetativa mediante macropropagación involucra el uso de métodos convencionales tales como injertos o enraizamiento de estacas. Es mediante el empleo de estas técnicas que ha sido posible la producción masiva de clones en algunas especies forestales.

El método tradicional de propagación vegetativa en la mayoría de las especies forestales es el estacado. Una de las desventajas es que las estacas van perdiendo su capacidad para enraizar a medida que el árbol de origen es más viejo. Además se sabe que el comportamiento de las estacas tiene mucho que ver con la edad del árbol, su vigor, la posición de la planta y la estación del año en que se cortan (Niembro, 1990).

Otra práctica usual en la propagación vegetativa consiste en seleccionar el árbol con mejores características y propagarlo mediante injertos. Los árboles sometidos a mejoramiento y pruebas de progenie han sido fuente de semilla; sin embargo, la descendencia no muestra las características favorables de los progenitores. Es importante mencionar que durante el transcurso de su desarrollo, las especies arbóreas pasan por una sucesión de cambios morfológicos y fisiológicos que de alguna forma afectarán su crecimiento. Generalmente los propágulos de regiones bajas y del centro del árbol poseen características más juveniles que las del resto del árbol y, por ende, esas regiones serían más susceptibles de ser propagadas vegetativamente.

Uno de los aspectos más importantes de la propagación vegetativa, es que mediante el empleo de cualquiera de las técnicas se están buscando características morfogenéticas deseadas en las plantas. (Niembro, 1990).

b) Micropropagación: Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos no es una técnica nueva. Desde la década de los 40's se han hecho aportaciones sustanciales a los programas de mejoramiento de muchas especies hortícolas y agrícolas, pero no es así en el caso de especies forestales, aun cuando los primeros estudios sobre esta técnica se hicieron en especies maderables. En 1960 el cultivo de tejidos de especies de coníferas se benefició con las investigaciones relacionadas con los requerimientos nutritivos de los tejidos cultivados *in vitro*. En la década del 70's ya se presentaban trabajos relacionados con la regeneración *in vitro* de diferentes gimnospermas (Villalobos *et al.*, 1983).

A diferencia de las especies anuales y bianuales, las especies perennes han mostrado mayor grado de dificultad para su micropropagación. Hoy día, aún cuando se han logrado algunos importantes adelantos, sobre todo en coníferas, en la mayoría de los casos se han empleado tejidos jóvenes como fuente de inóculo, ya que los tejidos y órganos maduros son poco sensibles a las condiciones *in vitro* (Arnold, 1981).

i) Organogénesis

Mediante el proceso organogenético es posible diferenciar brotes y raíces adventicias, hasta formar una planta completa. La micropropagación es influenciada grandemente por el genotipo, el estado fisiológico del explante, la planta donadora del explante, así como de las condiciones ambientales *in vitro* y los medios de cultivo.

Particularmente en coníferas, el método de propagación *in vitro* usado con más éxito ha sido la producción de brotes adventicios a partir de cotiledones de semillas en germinación; se reporta su uso en más de 25 especies de gimnospermas. Algunas de las especies en las que se reporta gran éxito en la propagación masiva de esta técnica son: *P. radiata* (Aitken *et al.*, 1981), *P. taeda* (Mott y Amerson 1981), *P. brutia* (Abdullah y Grace 1985), *P. virginiana* (Chang *et al.* 1991), *P. eldarica* (Sen *et al.*, 1993).

Los tejidos jóvenes han mostrado mejores respuestas *in vitro* que los maduros; sin embargo, los tejidos maduros tienen la ventaja de que ya han expresado su potencial genético, cosa que no ocurre en los tejidos jóvenes. Con respecto a éstos, se han cultivado embriones, cotiledones, hipocótilos, epicótilos. En pinos los embriones o partes de ellos han sido una fuente importante para la diferenciación de brotes adventicios. Estos tejidos son aparentemente una fuente ideal debido a que son meristemáticos por naturaleza y no requieren de una fase intermedia de callo para la producción múltiple de brotes. La frecuencia en el uso de embriones aislados no implica necesariamente que otras partes no puedan progresar *in vitro* (Sutter, 1988)

La formación de plantas *in vitro* mediante organogénesis se puede dividir en cuatro etapas: 1) iniciación de yemas, 2) paso de yemas a brotes, 3) enraizamiento de los brotes y 4) trasplante a suelo (Villalobos *et al.*, 1983).

ii) Embriogénesis somática

La micropropagación mediante embriogénesis somática involucra el desarrollo de embriones a partir de células embriogénicamente competentes *in vitro*. En contraste con la organogénesis, la embriogénesis somática es un proceso de una sola etapa, ya que implica la formación del embrión completa, esto es, el brote de un polo y la radícula en el otro, tal como ocurre en el embrión cigótico. Las células somáticas pueden ser inducidas *in vitro* hacia un proceso embriogénico por medio del cual se diferenciarán estructuras bipolares similares a los embriones cigóticos. El interés práctico de este método de propagación es que haciendo uso de genotipos deseables, éstos se pueden multiplicar casi ilimitadamente, con relativa facilidad y en forma sincrónica (Tautorus *et al.*, 1991).

En algunos casos el proceso embriogénico implica el establecimiento de callos en división activa obtenidos de un inoculo deseable. El callo o el cultivo en suspensión puede ser estimulado a formar embriones al manipular la relación auxinas-citocininas. Aunque este método para lograr la diferenciación no se puede aplicar a todas las especies con igual éxito, se ha encontrado que si la concentración de auxinas es alta en fases iniciales y se elimina la auxina en la etapa de proliferación, se induce la diferenciación de embriones somáticos. Dado el creciente interés en el estudio de estos procesos en

especies forestales, se ha observado un incremento en la información sobre embriogénesis somática en dichas especies de coníferas (Von Arnold y Hakman, 1987., Tautorus *et al.*, 1991).

El inoculo más adecuado para el proceso de iniciación en la mayoría de los casos es el embrión cigótico inmaduro o bien el gametofito conteniendo al embrión cigótico que es colocado en un medio de cultivo (Tautorus *et al.*, 1991).

Se distinguen cuatro etapas que conducen a la formación de embriones somáticos que son: iniciación, proliferación, maduración, conversión (germinación) y se proponen las siguientes etapas para el desarrollo de los embriones: etapa 1) embriones pequeños, transparentes, constituidos básicamente por la región de la cabeza y células suspensoras; etapa 2) (globular) embriones prominentes, opacos; etapa 3) (corona) embriones con cotiledones; etapa 4) embriones con radícula (Newton *et al.*, 1995).

En especies arbóreas, especialmente en coníferas, las investigaciones sobre embriogénesis somática son muy escasas, en comparación con las que se han realizado sobre las especies herbáceas

D) Propagación *in vitro* de especies forestales.

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica de gran utilidad para la rápida multiplicación clonal de muchas especies. Aunque la micropropagación de leñosas se ha efectuado más lentamente que la de herbáceas, las técnicas de microcultivo se han aplicado a varias especies de angiospermas.

En algunas especies de *Quercus acutissima* se ha estudiado el efecto del tamaño y origen del explante que se emplea al establecer un cultivo *in vitro*. Al emplear yemas axilares de árboles maduros (10 años), la propagación se hace difícil. Los mejores resultados se obtienen al utilizar yemas axilares de plantas de dos meses de edad. Al emplear brotes embrionarios cotiledones y ejes embrionarios se produce embriogénesis con MS a la mitad de concentración; GA y BAP 1mgL^{-1} cada uno (Shoyama *et al.*, 1992).

San José (1986) reporta que después de seis semanas de cultivo se obtienen buenos resultados al utilizar secciones nodales y basales, disminuyendo las tasas de elongación y proliferación al emplear las yemas apicales. La citocinina empleada para la inducción del desarrollo de yemas axilares fue la BAP (0.1 mg/l).

Von Arnold y Erikson (1981) aislaron embriones de *Pinus contorta*, induciendo brotes adventicios en un medio suplementado con citocininas. Después del desarrollo de brotes se transfirieron a un medio sin citocininas. El crecimiento de brotes se indujo por la adición de carbón activado al medio basal y un pequeño porcentaje de brotes fueron enraizados. La capacidad de formación de brotes varía dependiendo de la zona de colecta de la semilla. En *Liquidambar styraciflua* muchos de los trabajos en cultivo de tejidos para la propagación clonal, se han hecho utilizando fuentes juveniles de explantes. La fisiología y anatomía de regeneración de plantas se estudia en base a las características del explante (Sutter, 1989).

Una de las mayores dificultades encontradas en propagación vegetativa de muchas especies forestales es la relación inversa que existe entre la edad del explante y la facilidad de enraizamiento, no obstante se han logrado enraizar árboles de zonas de temperatura variada como *Populus*, *Quercus*, *Liquidambar*, *Acer*, *Castanea*, etc. En áreas tropical o sub-tropical en donde hay especies comercialmente importantes han sido propagadas exitosamente los géneros *Eucalyptus*, *Casuarina*, *Gmelina* y *Ficus*, entre otras (Brown y Sommer, 1980)

Especies de mayor interés económico como *Ceiba pentandra* se han micropropagado recientemente, probando distintos antioxidantes como el ácido ascórbico, ácido cítrico y pirogalol; en el crecimiento y la inducción de brotes adventicios a partir de yemas (Uribe, 1998).

La caoba (*Swietenia macrophylla*), siendo una especie de muy cotizada por la madera fina que produce, ya ha sido estudiada a nivel de cultivo de tejidos vegetales, lográndose diferenciar brotes adventicios (Bonilla, 1999).

Cedrela odorata, siendo una especie forestal de interés económico no ha sido estudiada con gran amplitud, aunque Enriquez (1985) logró la propagación del árbol a partir de segmentos de tallo apicales y subapicales.

Por otro lado, técnicas más avanzadas como la encapsulación alginada de brotes y yemas axilares para la producción de semillas artificiales han logrado la regeneración de plantas en un 28.6% en *Cedrela odorata* y en un 100% en *Guzuma crinita* (Muruyama *et al.*, 1997).

E) Medio de cultivo

El éxito del cultivo de tejidos vegetales se debe en gran medida a la naturaleza del medio de cultivo. Para un crecimiento vigoroso y saludable, las plantas necesitan de un suelo con macronutrientes (sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y azufre) y micronutrientes (sales de hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto). El medio de cultivo no sólo debe contener sales de micro y macronutrientes, también debe contener una fuente de carbono, comúnmente sacarosa, así como otros compuestos orgánicos entre los que se encuentran algunas vitaminas, antioxidantes y reguladores de crecimiento, además de incluir un gelificante (George y Sherrington, 1984).

a) Macroelementos

Los elementos que han demostrado ser importantes para el cultivo de tejidos son:

El nitrógeno es importante en el metabolismo de proteínas y aminoácidos, y por tanto juega un papel importante en el crecimiento y diferenciación. En la planta intacta, al proveerse de nitrógeno, se afecta la morfología de un modo característico en la elongación de hoja y tallo. En los medios de cultivo de tejidos, el nitrógeno es abastecido por el nitrato, sal de amonio, aminoácidos y productos orgánicos complejos como la caseína y leche de coco hidrolizada. La aplicación de nitratos puede conducir a la ramificación de raíces, al rompimiento de dormancia en semillas y yemas, en estas últimas al liberar la dominancia apical (Uribe, 1998; González, 1999).

Los medios con el nitrato como la fuente única de nitrógeno pueden llegar a ser más alcalinos con el tiempo, controlándose con la adición de pequeñas cantidades de sal de amonio (Devlin, 1982).

El potasio es el catión más abundante en la célula, juega un papel importante en el control osmótico. En el citoplasma activa un número importante de enzimas, incluyendo varias que actúan en la glucólisis y en la síntesis de proteínas. El citoplasma necesita de este elemento para la actividad fotosintética, el control del proceso de transporte de la membrana y para la regulación del pH citoplásmico (Bidwell, 1980).

En el medio nutritivo la captación de potasio se estimula por citocininas y luz, pero es inhibido por ABA.

El calcio es un componente de la pared celular, membranas y lignina. Su concentración es frecuentemente baja en los medios, principalmente a causa de su baja solubilidad en agua; esto puede conducir fácilmente a que se de una deficiencia de calcio en los tejidos, lo cual provoca necrosis (González, 1999).

El magnesio activa muchas enzimas, es un componente estructural de la clorofila y se requiere que mantenga íntegro el ribosoma, el ácido nucleico y la membrana; interactúa fuertemente con el calcio y el manganeso. En algunos medios como el Litvays, medio que se usa para coníferas, la concentración empleada es alta. La captación de magnesio se inhibe a pH bajos (Bonga y Aderkas, 1992).

El fósforo a nivel orgánico, forma parte del ácido nucleico y de los fosfolípidos, además de intervenir en la glucólisis y en la fotofosforilación. El fósforo en el sustrato es asimilado en forma de iones fosfato y la cantidad de iones disponibles depende del pH del sustrato, además de la presencia de otros elementos como el hierro, el aluminio y el calcio.

La movilización de almidón daña hojas en las plantas deficientes de fósforo. En tales plantas, se da la acumulación de almidón en cantidades excesivas en el cloroplasto. La biosíntesis de etileno es inhibida por niveles altos de fosfato inorgánico en el medio incubado. Aumentar el nivel del fosfato en el medio de cultivo puede provocar elongación y producción de brotes (Bonga y Aderkas, 1992).

Al **azufre** la planta lo absorbe en forma de ion sulfato. Al igual que el ion fosfato, el ion sulfato es débilmente absorbido, aunque la absorción aumenta al disminuir el pH del sustrato. El azufre se encuentra en el aminoácido metionina, cisteína y en la vitamina tiamina. Algunos cultivos crecen bien, indistintamente sobre medios que contienen aminoácidos (Devlin, 1982).

b) Microelementos

El **hierro** funciona en gran variedad de procesos redox. Se encuentra en la enzima nitrato reductasa, catalasa, en el citocromo respiratorio y otras enzimas. El hierro es más fácil de absorber por las plantas en su forma ferrosa, pero también pueden ser absorbidas cantidades significativas de ion férrico.

El hierro en el medio de cultivo es un contribuyente importante en la destrucción de AIA. En algunos medios de cultivo, incluyendo el medio de MS, el hierro tiende a formar precipitados con el fosfato. La precipitación de hierro puede conducir a una deficiencia en el tejido cultivado que es propiciada por un pH alto (Bonga y Aderkas, 1992).

El **manganeso** también es tomado por la planta en forma de ion. El manganeso es tóxico en presencia de molibdeno en concentraciones más altas y su exceso conduce a la deficiencia de hierro.

En cultivo de tejidos actúa como cofactor en la oxidación de AIA y cataliza la oxidación de protectores de auxinas. En algunas especies vegetales la omisión de manganeso provoca que se reduzca el número de brotes iniciales (George y Sherrington, 1984).

El **zinc** está presente en una variedad de enzimas incluyendo la ARN polimerasa y algunas deshidrogenasas. El zinc también tiene importancia para la síntesis de triptofano. La captación de zinc es inhibida por el cobre y el hierro pero es estimulado por el sulfato. La deficiencia de zinc en cultivo de tejidos es mas común que la deficiencia de cobre (George y Sherrington, 1984).

El boro es un elemento esencial que está relacionado con el metabolismo del calcio, con la biosíntesis de la pared celular, lignificación, diferenciación del xilema, elongación de la célula y el metabolismo de auxinas y fenoles. El boro también juega un papel en el funcionamiento apropiado de la membrana celular. Algunas veces estimula las raíces, posiblemente por la estimulación de la lignificación, o por reducir el nivel endógeno de auxinas o por la activación del AIA oxidasa (Bonga y Aderkas, 1992).

El cobre como el hierro, tiene un papel en los procesos redox y es un cofactor en la citocromo oxidasa. Los niveles de cobre son más altos en tejidos juveniles, especialmente en embriones; ésto sugiere que el explante juvenil puede requerir más cobre y menos manganeso para el crecimiento que uno maduro. El cobre en cantidades altas en el medio, puede activar al cobre contenido en la fenolasa y así causar oscurecimiento en los tejidos, por otro lado, la razón de que se toleren niveles normalmente tóxicos en algunos medios, puede deberse al exceso de EDTA (Bonga y Aderkas, 1992)

El molibdeno está presente en varias enzimas como la nitrato reductasa. Cuando las plantas presentan deficiencias de molibdeno, la nitrato reductasa provoca acumulación de nitrato a niveles tóxicos. A diferencia de otros elementos el molibdeno se hace más aprovechable al aumentar el pH del suelo (Bonga y Aderkas, 1992).

El cobalto es un elemento que reduce el calcio o el cobre, induce a la producción de etileno e inhibe la actividad de auxinas y citocininas. En la zanahoria cultivada ha estimulado la embriogénesis por la capacidad inhibidora del etileno. En otros cultivos, sin embargo, la inhibición de la síntesis de etileno por el cobalto o níquel, ocasiona la inhibición de embriones somáticos (Bidwell, 1980).

c) Vitaminas

Las vitaminas son sustancias requeridas por las células vegetales para cumplir o llevar a cabo ciertas acciones catalíticas esenciales en el metabolismo. Las plantas a diferencia de los animales, son capaces de sintetizar sus propios requerimientos de vitaminas, sin embargo, esto no necesariamente ocurre en las células vegetales en cultivo (George y Sherrington, 1984).

En muchos experimentos, los requerimientos de estas sustancias por las células vegetales en cultivo se suministran por medio de suplementos definidos, como jugos de frutas, agua de coco, caseína hidrolizada y otros; en el caso del agua de coco, la propiedad promotora del crecimiento parece parcialmente ser debida a la presencia de mio-inositol (García, 1991).

La mezcla de vitaminas utilizadas por Murashige y Skoog (1962) combinando el mio-inositol, tiamina, ácido nicotínico y piridoxina, ha tenido éxito para el cultivo de tejidos vegetales de muchas especies. Sin embargo, se ha encontrado que el mio-inositol y la tiamina son esenciales, por ejemplo, para el crecimiento de tejidos de tabaco, si se aumenta su concentración y se omite el ácido nicotínico y la piridoxina (George y Sherrington, 1984).

d) Fuente de carbono

Normalmente, para el cultivo de tejidos, células u órganos *in vitro* es necesario incorporar al medio de cultivo una fuente de carbono, ya que la insuficiencia de asimilación clorofílica hace a los tejidos heterotróficos.

Los carbohidratos son de fundamental importancia para la iniciación floral, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha considerado también que los niveles de azúcar requeridos para el desarrollo vegetativo y la morfogénesis, son más bajos que aquéllos requeridos para el desarrollo reproductivo (García, 1991).

La sacarosa es el carbohidrato mas ampliamente utilizado para propósitos de micropropagación y el azúcar doméstica refinada es suficientemente pura para usos prácticos, aunque se han empleado glucosa, fructosa y galactosa en algunos trabajos. La adición de sacarosa al medio de cultivo, sin embargo, inhibe la formación de clorofila, haciendo menos factible el crecimiento autótrofo (George y Sherrington, 1984).

e) Antioxidantes

Uno de los problemas más persistentes al establecer un cultivo *in vitro* es la oxidación de los explantes, es por eso que el medio es adicionado con compuestos antioxidantes. Algunas plantas secretan compuestos fenólicos que provocan oxidación, inhibiendo la actividad enzimática, matan al explante y oscurecen el medio de cultivo.

Los antioxidantes comúnmente usados en cultivo de tejidos vegetales son el ácido ascórbico, el ácido cítrico, cisteína y otros compuestos con alta afinidad por sustancias fenólicas como la polivinilpirrolidona, pirogalol y carbón activado (Uribe, 1998).

f) Reguladores de crecimiento

En los tejidos de las plantas hay sustancias endógenas que tienen una función regulatoria más que nutricional en el crecimiento y desarrollo; estos compuestos que son regularmente activos a bajas concentraciones, son conocidos como reguladores de crecimiento o fitohormonas. Algunas de estas sustancias son preparadas sintéticamente o extraídas de plantas, y se aplican exógenamente al medio de cultivo para controlar algún proceso fisiológico del crecimiento o desarrollo de la planta.

Las propiedades más comunes de las fitohormonas son que se sintetizan en algún órgano de la planta (hojas jóvenes, yemas, ápices de raíz y tallo) y son transportadas a otros sitios en donde estimulan los procesos de crecimiento y desarrollo; por otro lado, son sintetizadas y funcionan en la planta en microcantidades. Finalmente, puede inducir cambios morfogénéticos en la planta debido a sus propiedades particulares. Los fitoreguladores más comúnmente empleados son auxinas, citocininas y ácido giberélico (García, 1991).

Las auxinas están involucradas en la división celular, en la elongación de la planta y en la síntesis de la pared celular. Las principales auxinas son el ácido indolacético (AIA), el ácido indolbutírico (AIB), el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D) (Uribe, 1998).

Las actividades biológicas de las auxinas son diversas, la diversidad resulta de la naturaleza del tejido vegetal y de la concentración de las mismas, ya que diferentes tejidos responden de una manera distinta a una misma concentración y a un mismo tipo de auxina, aun más, tejidos anatómicamente idénticos dan diferentes respuestas dependiendo de su edad y estado fisiológico (García, 1991).

Las citocininas promueven la división celular, inducen la formación de brotes adventicios, controlan la dominancia apical y la morfogénesis de explantes *in vitro*. Las citocininas más comúnmente usadas son la 6-bencilaminopurina (BAP), la kinetina, la 2-isopentiladenina (2ip), y la zeatina (Uribe, 1998).

Las giberelinas actúan en el alargamiento de los entrenudos, en la floración, en ciertas fases de la germinación de las semillas y en el rompimiento del letargo. Existen más de cincuenta giberelinas caracterizadas, la primera en purificarse fue la AG₃. A diferencia de las auxinas, las giberelinas parecen moverse libremente por toda la planta y su patrón de distribución y de transporte no es polar como el de la auxina. En el cultivo de tejidos se utilizan explantes organizados (meristemas, ápices, yemas) (Bidwell, 1980).

F) Generalidades de *Cedrela odorata* L.

El cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) es un árbol originario del trópico mexicano. Se desarrolla en suelos arcillosos y arenosos, de textura ligera y bien drenados. Se adapta a diferentes condiciones del trópico con una temperatura media anual que oscila entre 22 y 28 °C (Patiño *et al.*, 1997).

Actualmente su distribución va desde la vertiente del Golfo desde Tamaulipas hasta Yucatán y Quintana Roo; y de la vertiente del Pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas, formando parte de los bosques tropical perenifolio, tropical subcaducifolio, y tropical caducifolio (Niembro, 1990).

G) Descripción botánica

El cedro rojo (*Cedrela odorata*, L.) es un árbol de la familia Meliaceae que alcanza una altura de 20 a 45 m, su fuste es recto y la copa amplia. Las hojas son alternas, compuestas de 5-10 pares de hojuelas opuestas, lanceoladas y con la base redondeada. La inflorescencia es una panícula de 30 a 35 cm. Florece en los meses de mayo o junio, el fruto es una cápsula leñosa de unos 4 cm, el cual madura al siguiente abril o mayo; sus semillas son aladas de color amarillo de 12 a 20 mm (Martínez, 1994; Enriquez, 1985).

H) Principales productos y utilización de *Cedrela odorata*

Su principal producto es la madera de excelente calidad que se utiliza para fabricar muebles finos, decoración de interiores, instrumentos musicales, cubiertas y forros de embarcaciones, lambrin, parquet, triplay, chapa, carpintería y ebanistería en general.

La infusión que se obtiene del cocimiento de hojas, raíz, madera y corteza, se utiliza en la medicina tradicional contra bronquitis, dispepsia, gastralgia, indigestión, fiebres, diarreas, vómitos, hemorragias y epilepsia. Las semillas poseen propiedades vermífugas. En algunos lugares se cultiva como planta de sombra y ornato (Niembro, 1990).

I) Propagación de *Cedrela odorata*

El cedro rojo (*Cedrela odorata*) es una de las especies forestales de mayor importancia en las zonas tropicales del país. Los trabajos de regeneración natural en esta especie han tenido poco éxito, pues en los bosques tropicales hay escasez de árboles semilleros y las plántulas de cedro frecuentemente son suprimidas por otras especies de más rápido crecimiento en la regeneración secundaria (Enriquez, 1985).

En cedro rojo se han realizado algunos trabajos de propagación vegetativa por medio de estacas e injertos. En estos trabajos se busca la conservación de genotipos valiosos para utilizarlos como fuente de semilla y para realizar trabajos de mejoramiento, pero en los reducidos niveles de multiplicación que se obtienen en estos métodos, no hacen posible llevar a cabo plantaciones con árboles propagados vegetativamente.

La plantación es, sin duda, el momento más crítico para la planta, la cual es trasladada desde el ambiente protegido de invernadero, al lugar definitivo, en donde estará sometida a una fuerte competencia por el agua y los nutrientes disponibles en el suelo, a periodos prolongados de sequía, al efecto del viento y a otra serie de factores físicos y bióticos que harán difícil su establecimiento. Por lo anterior, la micropropagación será el paso inicial, pero quizá el fundamental, para lograr un mayor éxito de la plantación, ya que a partir de esto se puede mejorar o mantener la calidad genética de los árboles y obtener mejores productos maderables (Patiño *et al.*, 1997).

La explotación del bosque tropical basado en el manejo natural intensivo, dificulta la obtención de rendimientos aceptables debido a:

- a) El establecimiento de la regeneración natural en *Cedrela* está limitado por la falta de árboles semilleros en suficiente número (Estrada, 1985).
- b) Las experiencias sobre regeneración natural incluso bajo los tratamientos intensivos, han demostrado que no son factibles económicamente (Vega, 1974; citado por Estrada, 1985).
- c) Es difícil producir el número de árboles de cedro que se espera en la cosecha final, porque depende del papel de otras especies que entran en juego. Esta situación ha llevado a numerosos técnicos a recomendar la repoblación del bosque tropical por medio de plantaciones para incrementar la existencia de maderas preciosas (Patiño *et al.*, 1997).

V. MATERIAL Y MÉTODOS

A) Procedencia del material a utilizar.

Las plantas de *Cedrela odorata* utilizadas en el presente trabajo provienen de la zona este del Mpo. Jaltipan, Veracruz, México. El lugar se localiza a 50-60 msnm, siendo la temperatura media anual es de 22 a 28°C, con una precipitación pluvial media de 1000 hasta 2000 mm. Esta especie se desarrolla en un suelo arcilloso- limoso con una vegetación asociada de mango y cocoite.

Las plantas de *Cedrela odorata* fueron proporcionadas por el vivero Cuahutoxca (aproximadamente 20), las cuales se seleccionaron tomando en cuenta su vigor y edad aproximada de seis meses. Se mantuvieron en condiciones de invernadero a una temperatura de $27\pm 2^\circ\text{C}$ con una humedad relativa del 60%, fertilizándose con medio MS a la mitad de concentración y fumigándose con captán al 50%. Los explantes empleados para el cultivo *in vitro* se obtuvieron de dichas plantas las cuales tenían una edad aproximada de un año.

B) Desinfección del material.

Debido a que el material vegetal era escaso, se disectaron tanto yemas apicales como adventicias, así como hojas de *Cedrela odorata*, las cuales se desinfectaron probando diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio, además se añadió bactericida comercial y Tween 20 en agua deionizada estéril. Los métodos probados se señalan más adelante.

C) Medio utilizado.

El medio que se probó fue el Heller (1953) y el Murashige y Skoog (1962) suplementado con fitoreguladores de crecimiento, azúcar comercial o sacarosa y phytigel; ambos fueron preparados a partir de soluciones concentradas 100 x. El pH se ajustó a 5.5-5.6 con NaOH 0.1 N y HCl 0.1 N antes de su esterilización en autoclave. La composición química de los medios se muestran en los apéndices.

Los recipientes utilizados fueron frascos de 40 ml de capacidad, con tapas de plástico. El medio se virtió a razón de 10 mL⁻¹ por frasco. Se sometieron a esterilización en autoclave vertical (121°C y 1.2 kg/cm² de presión).

D) Manejo de los explantes

Las yemas apicales y axilares previamente desinfectadas se colocaron a razón de una yema por envase cuidando que quedara bien sembrada y en el centro. Las hojas se dividieron en fragmentos de aproximadamente medio centímetro, colocándose de tres a cuatro en cada envase con el envés hacia el medio.

E) Incubación de los explantes

Los envases con medio una vez sembrados se colocaron en un anaquel dentro de un cuarto de incubación a una temperatura de 27°C ± 1°C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, utilizando lámparas de luz blanca continua de 29 μEm²s de intensidad.

F) Tratamientos y diseño experimental

La parte experimental del presente trabajo se dividió en tres etapas:

- I. Método de esterilización,
- II. Selección del explante y medio básico y
- III. Determinación de las concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento, fuente de carbono y antioxidante, tal como se presenta la figura 1.

G) Análisis de resultados

Los datos obtenidos de contaminación, oxidación y presencia de callo se analizaron calculando el porcentaje. En cuanto al número de brotes y crecimiento de los mismos se hizo un análisis de desviaciones estándar y coeficiente de variación.

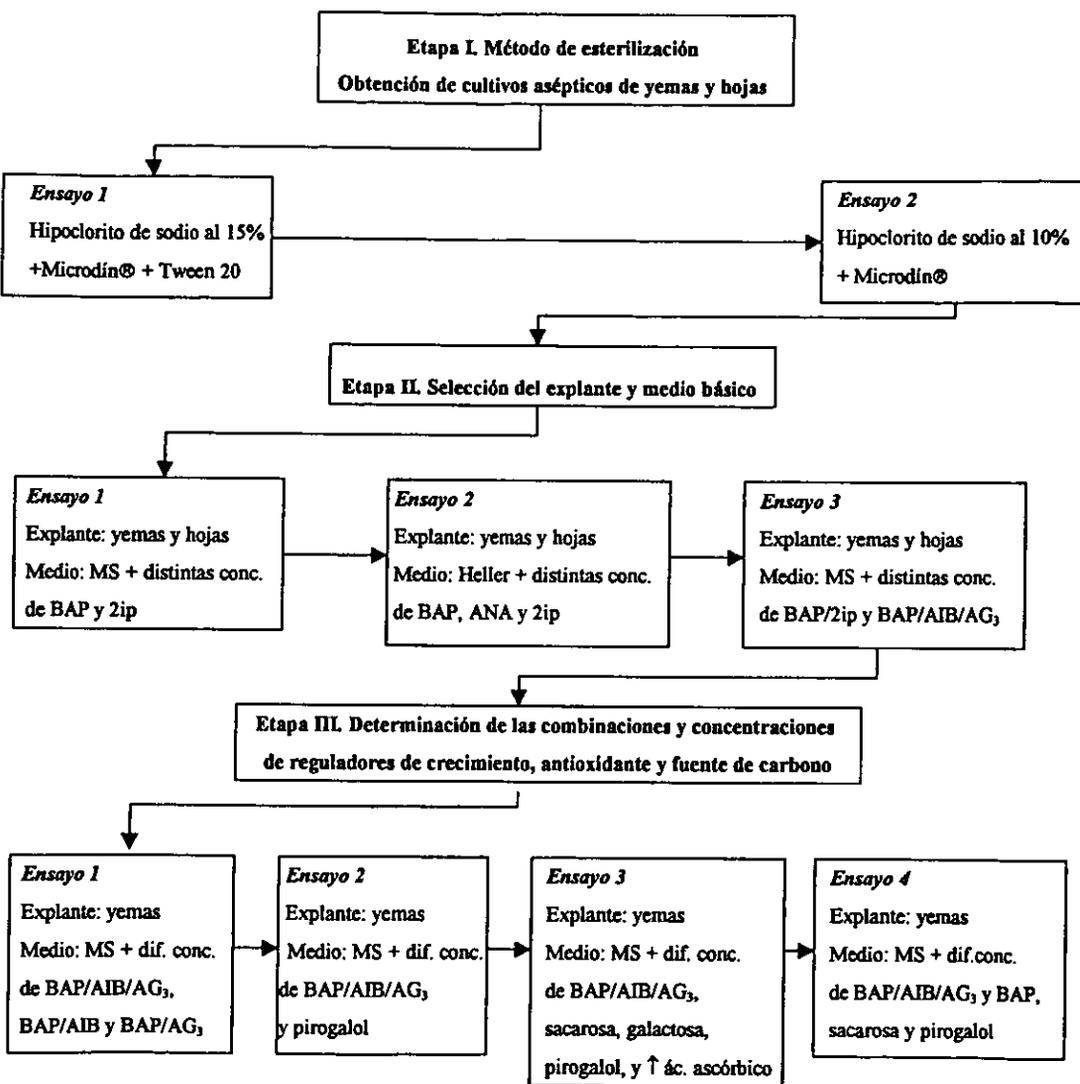


Fig. 1. Diagrama de flujo de los métodos probados *in vitro* para *Cedrela odorata*.

a) Método de esterilización.

Al establecer un cultivo *in vitro* el material vegetal debe someterse a un tratamiento que deje libre de patógenos los explantes. Los métodos probados fueron:

Ensayo 1.

1. Los explantes empleados fueron yemas apicales y axilares, así como hojas jóvenes, obtenidos de plantas donadoras mantenidas en invernadero.
2. Se lavaron por separado yemas y hojas con solución de agua y jabón comercial durante 15 minutos en agitación constante.
3. Se introdujo el material a la campana de flujo laminar y se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio (Clorox®) al 15% (v/v), con Tween 20 y bactericida a base de una solución coloidal de plata (Microdín®) 8 y 20 gotas por cada 250 ml, respectivamente, durante 7 minutos con agitación constante.
4. Finalmente se realizaron 4 enjuagues de cuatro minutos cada uno con agua desionizada estéril, para posteriormente sembrar

Ensayo 2

Debido a que los explantes se dañaron con el método empleado anteriormente, se modificó para este ensayo de la siguiente manera: el hipoclorito de sodio se añadió al 10% y se eliminó el Tween 20 para poder pasar a la siguiente etapa.

b) ETAPA II. Selección del explante y medio básico

En esta etapa se presentan los ensayos que permitieron elegir el explante y el medio básico para proseguir con las siguientes etapas de cultivo. Cabe señalar que en esta etapa no se pudieron probar varios medios a la vez dado que la producción de yemas se veía limitada al número de plantas, aún cuando estas fueron fertilizadas, además de agregar BAP para estimular la brotación.

Ensayo 1

En este ensayo se sembraron yemas axilares y/o apicales, así como hojas, utilizando como medio básico las sales inorgánicas y compuestos orgánicos del medio MS, probándose tres combinaciones distintas de reguladores de crecimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Medio MS con tres concentraciones de citocininas para el cultivo de yemas y hojas de *Cedrela odorata*

Fitoregulador (mg L ⁻¹)	MS1	MS2	MS3
BAP	12.3	10.3	6.3
2ip	1.3	2.3	3.3

Se sembraron 10 repeticiones de cada medio, tomándose datos de porcentaje de oxidación y de brotación cada semana por 30 días.

Ensayo 2

Dado que en el ensayo anterior los resultados no fueron satisfactorios se decidió probar el medio Heller con las concentraciones hormonales que se muestran en la tabla 2, tanto para hoja como para yema. El medio Heller 3 no se probó en yemas debido a los resultados obtenidos.

Tabla 2. Medio Heller con diferentes combinaciones y concentraciones hormonales para yema y hoja de *Cedrela odorata*

Fitorregulador (mg L ⁻¹)	Heller 1		Heller 2		Heller 3
	Yema	Hoja	Yema	Hoja	Hoja
BAP	12.3	5	10.3	3	6.3
ANA	–	1.5	–	1.5	–
2ip	1.3	–	2.3	–	3.3

Nuevamente se sembraron 10 repeticiones por tratamiento tomándose datos cada semana de porcentaje de oxidación y longitud del brote por 30 días.

Ensayo 3

En base a los resultados no efectivos al emplear el medio Heller en el ensayo 2, se recurrió nuevamente al medio MS variando la concentración y adición de fitorreguladores. Los tratamientos probados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Medio MS con diferentes combinaciones y concentraciones hormonales para hoja y yema de *Cedrela odorata*

Fitoregulador (mg L ⁻¹)	Medio de Cultivo		
	T0	T1	T2
BAP	6.3	3.15	1.0
2ip	3.3	1.7	—
AIB	—	—	1.0
AG3	—	—	0.1

Los explantes en esta etapa se evaluaron cada semana en cuanto a porcentaje de oxidación, callo y brotes. El subcultivo se realizó a los 30 días.

c) ETAPA III. Determinación de las combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento, fuente de carbono y antioxidante

Ensayo I

Se hizo una combinación de las hormonas en base al tratamiento T2 del ensayo anterior para ver si el efecto positivo que se presentó estaba dado por la combinación de éstas tres hormonas, además de adicionar ácido ascórbico como antioxidante.

Tabla 4. Medio MS probado en yemas con diferentes combinaciones hormonales de *Cedrela odorata*

Fitoregulador (mg L ⁻¹)	Medio de Cultivo		
	T2	T3	T4
BAP	1.0	1.0	1.0
AIB	1.0	-	1.0
AG ₃	0.1	0.1	-

En este ensayo se tomaron datos de oxidación, presencia de callo y número de brotes por tratamiento.

Ensayo 2

En este ensayo se variaron las concentraciones en los reguladores de crecimiento, además de adicionar 13 mg L⁻¹ de pirogalol como antioxidante (Tabla 5).

Tabla 5. Medio MS probado en yemas de *Cedrela odorata* diferentes conc. de tres reguladores de crecimiento

Compuesto (mg L ⁻¹)	Medio de Cultivo		
	T5	T6	T7
BAP	1	1.5	0.5
AIB	1	1.5	0.5
AG3	0.1	0.1	0.1
Pirogalol	13	13	13

En este caso se tomaron datos cada semana de tamaño de brotes y oxidación durante 30 días y dos semanas después del subcultivo.

Ensayo 3

En el ensayo anterior se obtuvieron resultados no satisfactorios que llevaron a la modificación del presente en las concentraciones y tipos de fuente de carbono y antioxidante.

Tabla 6. Medio MS con variantes en el tipo y concentración de fuente de carbono y antioxidante para yemas de *Cedrela odorata*

Compuesto (mg L ⁻¹)	Medio de Cultivo					
	T8	T9	T10	T11	T12	T13
BAP	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
AIB	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
AG3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Sacarosa	3.8%	3.8%	–	–	3.8%	1.5%
Galactosa	–	–	2.0%	2.0%	–	–
Piragalol	26	26	26	26	26	26
Ac. asc.	–	–	–	100	100	–

Se tomaron datos de oxidación, número y tamaño de brotes y presencia de callo, cada tres días durante 36 días tomando en cuenta que los subcultivos se hicieran cada dos semanas. En cuanto al número y tamaño de brotes se calcularon desviación estándar y coeficiente de variación.

Ensayo 4

Finalmente y tomando en cuenta los mejores resultados obtenidos en el ensayo 3 se modificaron las concentraciones de la sacarosa y las combinaciones hormonales.

Tabla 7. Medio MS con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, probados en yemas de *Cedrela odorata*

Compuesto (mg L ⁻¹)	Medio de Cultivo					
	T8	T9	T13	T14	T15	T16
BAP	1	0.5	0.5	3	3	1
AIB	1	0.5	0.5	-	-	-
AG3	0.1	0.1	0.1	-	-	-
Sacarosa	3.8%	3.8%	1.5%	3.8%	1.5%	1.5%
Pirogalol	26	26	26	26	26	26

Los datos se obtuvieron de la misma manera que en el ensayo 3.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A) Etapa I. Método de esterilización

Ensayo 1

La desinfección de los explantes en este ensayo no tuvo una efectividad considerable, aunque no hubo contaminación, se presentó un alto grado de oxidación que provocó la muerte del tejido. Lo anterior debido a la concentración del hipoclorito de sodio y al empleo del Tween 20, detergente que rompe la tensión superficial de los tejidos haciendo las membranas más permeables a sustancias empleadas en la desinfección. Esto se evidencia con el aclaramiento del tejido seguido de la oxidación hasta que el explante se muere al llegar a los 30 días del establecimiento, antes del subcultivo (Hurtado y Merino, 1994, George y Sherrington, 1984).

Ensayo 2.

Por los resultados obtenidos en el ensayo 1, se tomó la decisión de disminuir la concentración del hipoclorito de sodio y así como omitir el Tween 20. En este caso, al igual que en el anterior ensayo no se presenta contaminación y la oxidación se redujo, por lo que se consideró efectivo.

Etapa II. Selección del explante y medio básico

La respuesta morfogénica del cultivo de tejidos está modulada por varios factores como el tipo de explante y el medio de cultivo entre otros, es por ello que en esta etapa se buscó determinar el explante que tuviera una mejor respuesta, así como el medio de cultivo que estimulara la diferenciación celular.

Ensayo 1

En este ensayo, como se observa en la tabla 8, el porcentaje más alto de oxidación en cuanto a los dos tipos de explante fue en hojas, siendo igual para los tres medios, para el caso de las yemas se observó que el medio MS1 promovió más la oxidación con un 60% del total de repeticiones. Esta oxidación presente en los explantes se caracterizó por ser abundante ya que en su mayoría abarcaba más del 50% de la superficie del explante.

Tabla 8. Oxidación de explantes de *Cedrela odorata* en tres variaciones del medio MS a los 30 días del establecimiento

Oxidación	MS1		MS2		MS3	
	Yemas	Hojas	Yemas	Hojas	Yemas	Hojas
P	30	—	40	—	50	—
M	10	—	40	—	30	—
A	60	100	20	100	20	100

P= Poca oxidación <10% del explante, M= Moderada oxidación >10% <50% del explante,

A= Abundante oxidación >50% del explante

Se han empleado varios tipos de explante para el estudio de procesos morfogénéticos, en árboles dicotiledóneos, como son hojas, cotiledones, yemas y estructuras reproductivas, sin embargo, las respuestas varían de acuerdo a la especificidad del trabajo en estudio.

Brown y Sommer (1980) señalan que las yemas de plantas jóvenes, potencialmente, tienen más capacidad de generar estructuras diferenciadas, ya que estos explantes tienen regiones meristemáticas y hormonas endógenas como el AIA, que promueven este efecto. En este sentido, la oxidación que se presenta en hojas, podría explicarse por la lenta respuesta organogenética que en ellas se da, ya que para diferenciarse pasa por un proceso de formación de callo (desdiferenciación), en el cual la oxidación invade más rápidamente el tejido, para finalmente matarlo. Sin embargo, esta explicación no es exclusiva, pues la presencia de fenoles en algunas plantas, sobre todo en leñosas, también puede provocar este efecto (George y Sherrington, 1984).

Por otro lado, en las yemas que se sembraron en el medio MS1, también hubo una oxidación alta, por lo que se tomó la decisión de modificar la parte inorgánica del medio, sustituyéndolo por sales inorgánicas del medio de Heller, ya que este medio presenta una menor fuerza iónica, lo cual representa una ventaja, ya que facilita el transporte de algunas sustancias del medio hacia las células, acelerando los procesos de morfogénesis (Uribe, 1998).

Ensayo 2

En este ensayo se empleó el medio Heller con distintas concentraciones de BAP ANA y 2ip con la finalidad de determinar la funcionalidad del medio para ambos tipos de explante (hojas y yemas)

Como ya se mencionó, algunas de las causas de oxidación en los explantes son el tipo y edad del explante, así como el medio nutritivo básico que se emplee. La constitución del medio Heller no influyó para disminuir la oxidación en hojas ya que en la tabla 9 se muestra que la oxidación es del 100%. Una posible explicación a este efecto puede deberse a que el medio Heller utilizado en el presente ensayo, tiene una baja concentración de sales que facilita la movilidad no solo de sustancias útiles para el crecimiento y desarrollo de la planta, sino también de las sustancias tóxicas que la misma planta secreta por lo cual la naturaleza del mismo explante podría ser el responsable de esta oxidación (Bonga y anderkas, 1992).

La carencia de molibdeno en el medio puede provocar la acumulación de niveles tóxicos de nitratos, ya que este elemento influye en la actividad de las enzimas nitrato y nitrito reductasa, además los medios que tienen nitratos como única fuente de nitrógeno son muy alcalinos lo cual puede afectar al aprovechamiento de algunas sales inorgánicas del medio provocando deficiencias en el crecimiento (Uribe, 1998).

Por otro lado a pesar de que el medio Heller ha sido utilizado por su baja concentración iónica, que en determinado momento podría favorecer el transporte de sustancias hacia las células, se ha visto que algunas plantas, particularmente especies forestales contienen una alta concentración de sustancias fenólicas que pueden provocar oxidación en el tejido provocando daño. En el caso de las hojas la disposición de las capas celulares y la escisión hecha a los cortes puede provocar que las sustancias fenólicas y los factores antes mencionados provoquen la oxidación que impidió una respuesta morfogénica deseada (George y Sherrington, 1984).

La combinación de hormonas se modificó ya que la capacidad de respuesta morfogénica en hojas y yemas puede variar, así al emplear BAP y ANA en hojas en concentraciones inferiores a las empleadas en el ensayo anterior, en el que se empleó BAP y 2ip, tanto en yemas como en hojas se pretendía inducir la formación de callo en hojas. La respuesta fue negativa ya que la oxidación se mantuvo en un 100%, aunque para este ensayo no se puede saber si las concentraciones hormonales eran las adecuadas.

Tabla 9. Presencia de oxidación a los 30 días del establecimiento en hoja y yemas de *Cedrela odorata*

Oxidación (%)	Heller 1		Heller 2		Heller 3
	Yema	Hoja	Yema	Hoja	Hoja
P	—	—	30	—	60
M	20	—	70	—	30
A	80	100	—	100	10

P= Poca oxidación <10% del explante, M= Moderada oxidación >10% <50% del explante,

A= Abundante oxidación >50% del explante

Ensayo 3

En este ensayo se tuvo como objetivo establecer el medio que pudiera generar brotes y así dar continuidad a la siguiente etapa de esta investigación, tomando como base que el medio MS es el que mejores resultados dio en el explante yema, por no presentar un alto índice de oxidación, factor que hasta el presente ensayo es determinante en la modificación del medio.

Dado que en el ensayo 2 el medio Heller presentó resultados no favorables, se empleó el medio MS ya que desde el ensayo 1 tuvo mejores resultados en las combinaciones de 6.3 y 3.3 mg L⁻¹ de BAP y 2ip respectivamente y la oxidación fue menor empleando como explante la yema. En el presente ensayo el menor porcentaje de oxidación se dio en el T2 que contenía 1.0, 1.0 y 0.1 mgL⁻¹ de BAP, AIB y AG₃ respectivamente.

La tabla 10 indica que la formación de callo no prosperó debido a que la oxidación avanza rápidamente impidiendo la proliferación del mismo, de la misma manera hay limitación en la formación y desarrollo de brotes. Si se analiza el empleo de los reguladores de crecimiento y las concentraciones de cada uno de ellos, se observa que para el medio T0 el cual tenía 6.3 y 3.3 mg L⁻¹ de BAP y 2ip respectivamente, la oxidación se presentó en un 60% rebasando la formación de callo que fue en un 30% del brote. De manera similar en el medio T1 en el que había 3.15 y 1.7 de BAP y 2ip respectivamente, la oxidación fue de 70% y la formación de callo de 50% del brote.

El BAP y el 2ip son reguladores del crecimiento (citocininas) que están involucradas en el proceso de división celular, síntesis de proteínas e inducción de brotes adventicios, el AG₃ (giberelina) es una sustancia que interviene en la germinación de semillas, floración e inducción de brotes y el AIB (auxina) influye en el alargamiento celular (Bidwell, 1980).

En este ensayo el medio T2 es el que presentó una menor oxidación del 20%, aunque la formación de callo sea elevada (70%). La formación de callo es parte de la respuesta morfogénica y se debe a la adición de BAP y 2ip, ya que como anteriormente se menciona dichos reguladores están involucrados en la división celular, aunque una vez que el brote se desarrolla, podría influir en el crecimiento del mismo al establecer competencia con el brote por nutrientes, sin embargo, esto es algo que puede remediarse en los subcultivos si se limpia del brote. Al contrario, la oxidación dificulta cualquier tipo de crecimiento como puede apreciarse en el ensayo 3, por lo que en base a estos resultados el medio que se elige es el T2, por la baja oxidación que presenta con respecto a los otros medios.

Tabla 10. Porcentaje de oxidación, callo y brotes en tres variaciones del medio MS,

en yemas de *Cedrela odorata*

Respuesta morfológica	Medio de cultivo		
	T0	T1	T2
Oxidación (%)	60	75	20
Callo (%)	30	50	70
Brotes/fco.	1	1	1

C) Etapa III. Determinación de las combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento, antioxidante y fuente de carbono.

Ensayo I

En base a los resultados obtenidos en el ensayo anterior se decidió probar tres medios en los cuales tuvieran distintas combinaciones y concentraciones de los fitoreguladores para que a partir de esto se defina si el efecto sobre la respuesta morfológica está dado por la combinación de BAP/AIB/AG₃, BAP/AG₃ o BAP/AIB.

Los resultados que se presentan en este ensayo indican que para el medio T2, el cual tiene 1.0, 1.0 y 0.1 mg L⁻¹ de BAP AIB y AG₃ respectivamente, la oxidación total es del 40%, siendo menor que para los medios T3 y T4, aunque hubo un porcentaje de explantes que no presentaron ninguna respuesta al medio. El T3 que contenía 1.0 y 0.1 mg L⁻¹ de BAP y AG₃ mostró un porcentaje del 50% de brotes sin callo y un 50% de explantes que formaron solo callo. En el medio T4, el cual contenía 1.0 mgL⁻¹ de BAP y AIB presentó un 70% de brotes sin callo, un 30% de explantes que formaron sólo callo.

Si se considera sólo la respuesta morfológica de los explantes, el medio más conveniente a utilizar sería el T4, ya que fue el que presentó el mayor porcentaje de brotes sin callo, sin embargo en este medio, la oxidación total fue del 60%. Aunque la respuesta morfológica, en cuanto a la formación de brotes en este medio haya sido mayor, la oxidación es un problema que debe tomarse en cuenta durante todas las etapas del cultivo *in vitro*, por lo cual se deben tomar en cuenta ambas características: brotes sin callo y sin oxidación, por lo que se recomienda el medio T2 aunque su respuesta morfológica fue más discreta en cuanto a la formación de brotes sin callo.

Tabla 11. Presentación de datos tomados en dos semanas en tres concentraciones distintas de MS

Respuesta morfológica (%)	Medio de cultivo		
	T2	T3	T4
1. Brotes sin callo	40	50	70
Oxidación	20	30	40
2. Sólo callo	30	50	30
Oxidación	20	40	20
3. sin brotes, sin callo	30	-	-
Oxidación	-	-	-
Oxidación total	40	70	60

El éxito en los cultivos *in vitro* depende de las concentraciones y combinaciones de los reguladores de crecimiento, por lo que en este ensayo se determinó el uso del medio T2, el cual contiene BAP, AIB y AG₃. El BAP es una citocinina, que combinada con una auxina (AIB), en una proporción de uno a uno promueve la formación de callo. El AG₃ en concentraciones de 1-8 mgL⁻¹, induce el crecimiento de callo indiferenciado en combinación con bajas concentraciones de auxina y citocinina (George y Sherrington, 1984)

La generación de callo en los explantes puede deberse a las concentraciones auxina/citocinina, aún después de añadir AG_3 en niveles a los que se considera no promueve la formación de callo, en combinación con los reguladores antes mencionados.

Ensayo 2

En el ensayo anterior se determinó usar las tres hormonas, ya que por los resultados que arroja parece ser que hay una sinergia en el empleo de ellas para reducir la oxidación, aunque la formación de callo se haya hecho presente, sin embargo, para este ensayo se decidió modificar las concentraciones de los fitoreguladores, para ver si el mismo efecto puede darse al emplear concentraciones más bajas que optimicen el costo en la utilización de ellas. Además se adicionó pirogalol como antioxidante en concentración de 13 mgL^{-1} . En la tabla 12 se presentan resultados de oxidación al adicionar pirogalol en los tres medios.

Los porcentajes de oxidación que se muestran en la tabla 12 indican que el 50% de los explantes cultivados en el medio T5 presentaron tan sólo un 10% de su superficie afectada por la oxidación, permitiendo el desarrollo de la yema. En los tres medios probados se aprecia que los explantes cultivados no presentaron una oxidación mayor al 50% de su superficie, debido a la adición de pirogalol al medio de cultivo. Aunque el porcentaje de oxidación es considerablemente bajo, este efecto podría reducirse aún más si se considera modificar las concentraciones o combinaciones de los componentes en el medio en su parte orgánica: reguladores de crecimiento, fuente de carbono o antioxidante.

El pirogalol es un buen reductor y se ha utilizado para absorción de oxígeno en análisis de gases, en algunos trabajos de cultivo de tejidos ya ha sido utilizado. Uribe (1998) reporta una concentración de 25 mg L^{-1} para una mejor respuesta en la inducción y crecimiento de brotes de *Ceiba*. En este caso mostró ser un buen antioxidante, ya que el medio con mayor porcentaje de oxidación fue el T6 con 50%. De cualquier manera, el efecto que se presentó no debe atribuirse a una sola parte que conforme el medio de cultivo, por lo que para los ensayos siguientes se determinaron otras condiciones.

Tabla 12. Oxidación de explantes de *Cedrela odorata* después de dos subcultivos, a los 30 días.

Oxidación (%)	Medio de Cultivo		
	T5	T6	T7
P	50	30	20
M	20	20	40
A	30	50	4

P= Poca oxidación <10% del explante, M= Moderada oxidación >10% <50%,

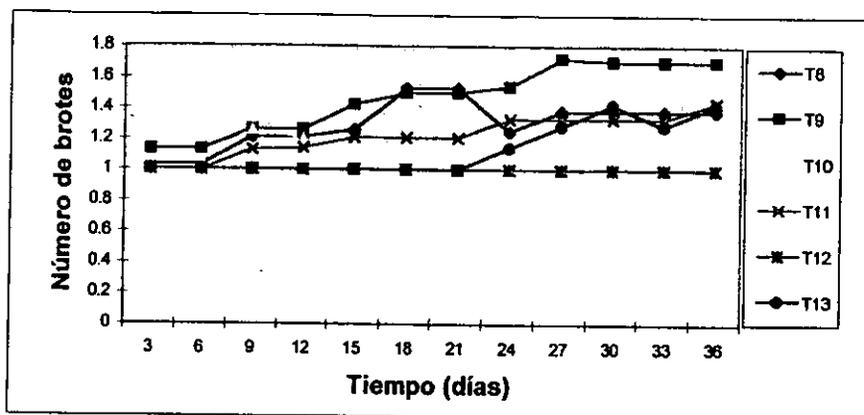
A= Abundante oxidación >50%

Ensayo 3

En los experimentos anteriores se determinó que el medio MS es el efectivo para el establecimiento de yemas, y se determinaron los fitoreguladores que participan en la iniciación de brotes. El pirogalol como antioxidante también se introdujo con una concentración más alta, además de mantener el ácido ascórbico, sin embargo los datos muestran que dicha oxidación prevalece (aunque en menor grado), así que para este ensayo se hicieron modificaciones a las concentración del antioxidante. La fuente de carbono y la concentración y combinación de fitoreguladores, fueron modificados con la finalidad de lograr que se diferenciaron el mayor número de brotes y que se alargaran.

En la gráfica 1 se observa que el medio T9 es el que presenta mejores resultados en cuanto al número de brotes, dicho medio contenía 0.5, 0.1 y 0.1 de BAP AIB y AG3 respectivamente, sacarosa al 3.8% y 26 mgL⁻¹ de pirogalol. Los medios con menor número de brotes fueron el T10 y el T12, los cuales tuvieron una concentración de fitoreguladores igual a la del T9, pero difieren en la concentración de sacarosa al 2.0% y 100 mgL⁻¹ de ácido ascórbico (T10) y sacarosa al 3.8% y 100 mgL⁻¹ de ácido ascórbico (T12). La curva del medio T9, que es la que indica el mayor número de brotes mantiene un comportamiento constante, el medio T10 por el contrario muestra un incremento en el número de brotes hacia el día 9 y en adelante decrece para mantenerse constante desde el día 15 con sólo un brote.

El resto de los medios mantienen un incremento en el día 9, decrece en el día 15 y vuelve a ascender para el día 24.



Gráfica 1. Número de brotes en cinco variaciones del medio MS a los 36 días del establecimiento de yemas de *Cedrela odorata*

Se ha visto que los eventos morfogénicos están relacionados con la acumulación o concentración de azúcar ya que actúa como reserva de energía durante la formación de brotes.

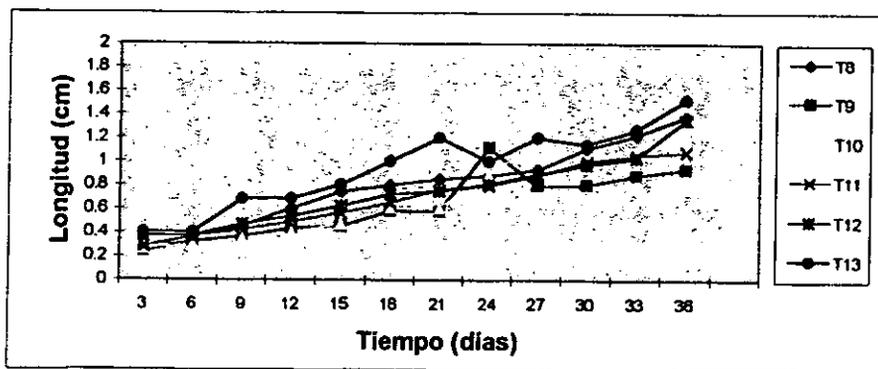
Por otro lado, el efecto osmótico que provoca la concentración de azúcar, también puede desencadenar algún tipo de respuesta morfogénica. La eficacia de iones de nitrato de amonio dependen de la concentración de sacarosa y el efecto de las citocininas en la división celular en cultivos de *Ceratodon purpureus* (George y Sherrington, 1984)

La sacarosa es la fuente de carbono más frecuentemente utilizada (2-3%) aunque en *Kahya ivorensis* se empleó como fuente de carbono la galactosa al 2% (Newton *et al.*, 1995).

Si consideramos los resultados obtenidos en las gráficas el medio T9 presenta el mayor incremento en longitud, pero en la gráfica 1 el número de brotes para este medio es el más bajo. Para el medio T10 la relación es inversa, es decir que presenta un bajo crecimiento pero hay mayor número de brotes. Esta respuesta podría atribuirse a la concentración de la fuente de carbono, ya que es la única variante entre el medio T9 y el T10.

En estudios con segmentos de tallo de tabaco la concentración óptima de sacarosa para la iniciación y crecimiento de yemas vegetativas fue de $1-15\text{gL}^{-1}$, la cual si se aumentaba a 50gL^{-1} promovía la formación de flores (García, 1991).

En la gráfica 2 se observa que para el medio T10, la longitud de los brotes es mayor, llegando casi a 2 centímetros en 36 días, además de que el crecimiento es constante, lo que no sucede en otros medios como el T9, el cual presenta un decaimiento en el día 24.



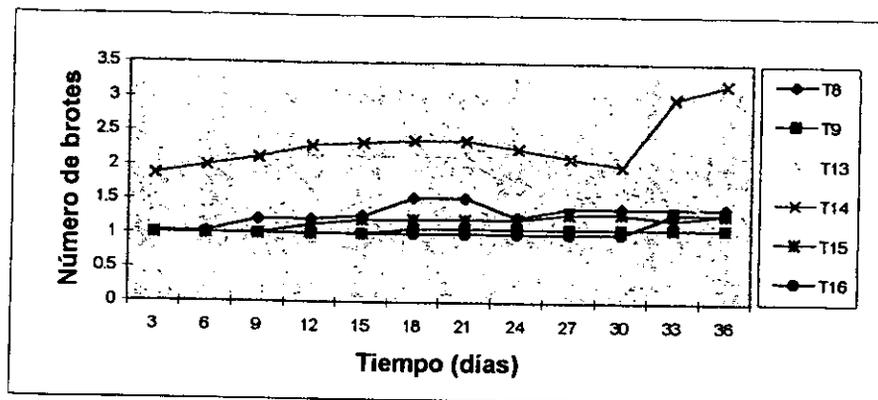
Gráfica 2. Longitud de brotes de *Cedrela odorata* en seis variaciones del medio MS a los 36 días del establecimiento.

Haciendo una comparación entre ambas gráficas, se nota que en el medio T9 y T10 hay un comportamiento inverso, entre el número de brotes y crecimiento de los mismos, ya que el medio T9 estimula la diferenciación de brotes, mientras que el medio T10 estimula su crecimiento, lo cual puede explicarse por la competencia de brotes por los elementos del medio que impide el crecimiento de todos, lo que no sucede con los medios en los que sólo se presenta un brote, el cual tiene un mayor crecimiento.

Ensayo 4

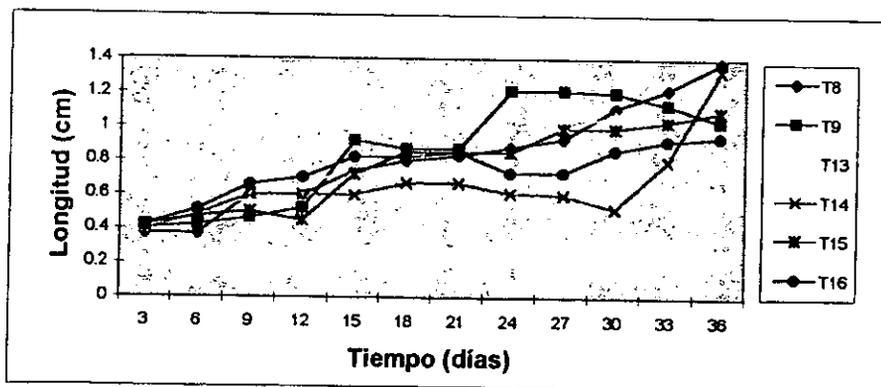
En este ensayo se hicieron modificaciones en los reguladores de crecimiento (combinación y concentración), omitiendo el uso de ácido ascórbico, puesto que la oxidación no avanzó más en los explantes. En cuanto a la fuente de carbono los resultados indican que la sacarosa presenta mejores resultados que la galactosa.

En la gráfica 3 el medio T14 es el que presenta un mayor número de brotes, ya que se mantiene por arriba de los otros medios, dicho medio contiene sólo 3 mgL^{-1} de BAP y sacarosa al 3.8% llegando casi a 3 brotes en 36 días. Este efecto puede deberse a la concentración de BAP ya que dicha concentración en algunos trabajos como el de Enríquez (1985) logró obtener con estas concentraciones un gran número de brotes. En los otros medios en donde la concentración de reguladores y sacarosa varía, la respuesta es inferior.



Gráfica 3. Número de brotes en seis medios del MS durante 36 días del establecimiento.

En los medios T8 y T14 se obtienen las longitudes mayores como se muestra en la gráfica 4. Si se analiza la curva del medio T8 se puede apreciar un crecimiento constante lo que no sucede con el medio T14 que mantiene un crecimiento constante hasta el día 27, disparándose en los días 30, 33 y 36. Cabe recordar que en los dos últimos ensayos se realizaron subcultivos cada dos semanas (15 días) que pudieron influir en la respuesta, aunque esta práctica se hizo para evitar oxidación en los explantes.



Gráfica 4. Longitud de brotes de *Cedrela odorata* en seis variaciones del medio MS durante 36 días de establecimiento.

En la gráfica anterior se observa que el medio T14, el cual fue el que presentó mayor número de brotes, logró, a pesar del decaimiento de la curva, alcanzar el mayor crecimiento, al igual que el medio T8, aunque este último mantiene un crecimiento constante.

El comportamiento de ascensos y descensos de las curvas en las gráficas 3 y 4, se puede relacionar con el coeficiente de variación calculado para cada una de ellas, en donde por ejemplo para el medio T14 de la gráfica 2, el coeficiente de variación (CV) es superior a 100, lo que hace pensar que posiblemente hubo muerte de algunos explantes, sobreviviendo los más grandes, que son los que en la gráfica se presentan (ver anexo 1). Por otra parte, el manejo de material vivo, genera valores de desviación grandes, ya que es difícil controlar el crecimiento en él, por ende su expresión genética. Tendrían que controlarse mayor número de variables que no están a nuestro alcance.

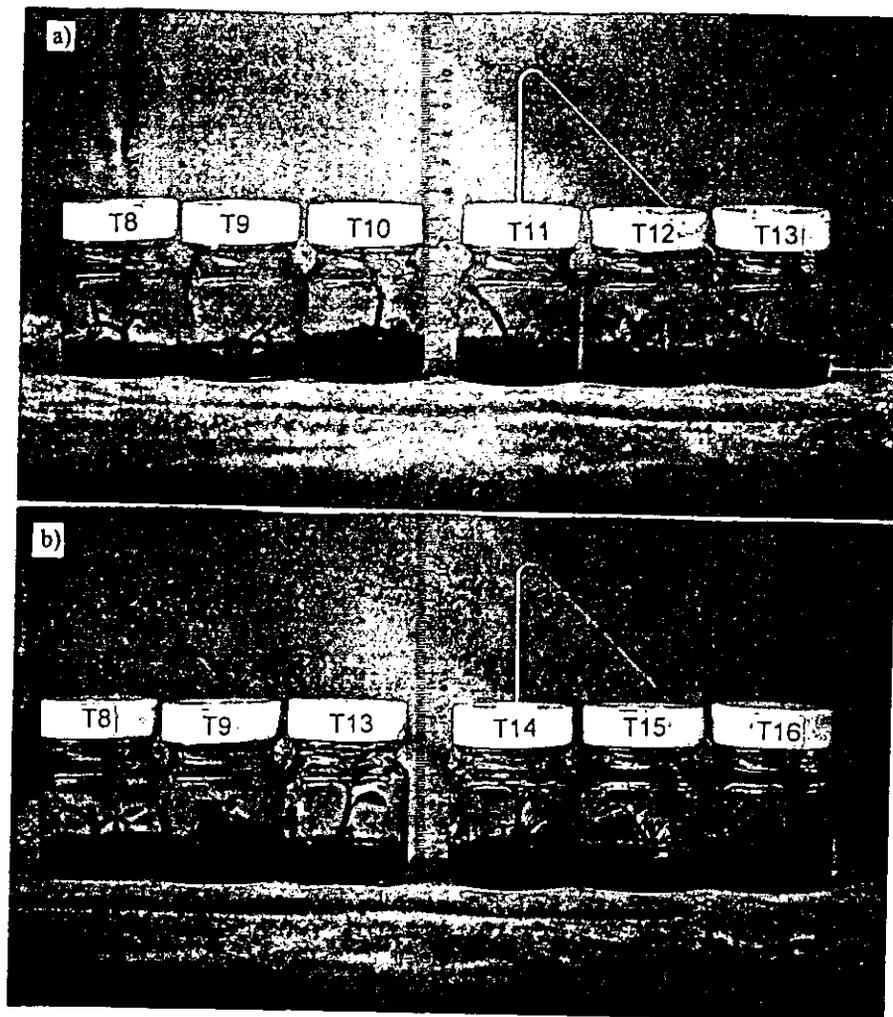


Fig. 2. a) Obtención de brotes adventicios a partir de yemas de *Cedrela odorata* cultivadas en seis medios del MS en los que se variaron el tipo y concentración de fuente de carbono y antioxidante.
b) Brotes adventicios diferenciados a partir de yemas de *Cedrela odorata* cultivadas en medio MS con modificaciones en los reguladores de crecimiento.

VII. CONCLUSIONES

La desinfección de los explantes, se llevó de manera eficiente al emplear una solución de hipoclorito de sodio al 10% y 20 gotas/250 ml de bactericida Microdín®, ya que no se presentó contaminación y la oxidación fue reducida.

La utilización del detergente Tween 20 afecta las condiciones del tejido en yemas y hojas, provocando oxidación y muerte del tejido.

El explante que menor porcentaje de oxidación presentó y cuya respuesta morfogénica se evidenció con la formación de brotes con callo, fue la yema al establecerse en un medio con sales del MS y suplementado con BAP; AIB y AG₃ en concentraciones de 1.0, 1.0 y 0.1 mgL⁻¹ respectivamente.

El medio MS a diferencia del medio Heller provocó menos oxidación en los explantes, ya que el medio Heller presenta una baja concentración de sales que facilita la movilidad de sustancias tóxicas como los fenoles, afectando el explante.

La oxidación es uno de los problemas más dañinos en cultivo *in vitro*, por lo que el pirogalol es un buen reductor al emplearse en concentraciones de 25 mgL⁻¹ y combinarse con 100 mgL⁻¹ de ácido ascórbico en el medio.

La sacarosa resultó ser la mejor fuente de carbono al añadirse 3.8% al medio, promoviéndose la formación y crecimiento de brotes.

La adición de 3 mgL⁻¹ de BAP promovió la formación de más de tres brotes con una longitud de 1.4 cm a los 36 días de cultivo.

El número de brotes es inversamente proporcional a la longitud de los brotes, por existir una competencia de nutrientes disponibles en el medio.

VIII. RECOMENDACIONES

Al establecer un cultivo *in vitro* se recomienda:

1. Tratar de manera diferencial las yemas (axilares y adventicias), ya que podrían arrojar resultados distintos, en cuanto a la formación y desarrollo de brotes.
2. Tomar en cuenta la edad de la planta donadora, en el momento en el que se disecte el explante, puesto que el estado fisiológico de la planta puede ayudar a una mejor interpretación de resultados
3. Seguir con esta investigación y mejorar un protocolo que permita en un plazo considerable propagar especies vegetales con importancia no sólo económica sino también ecológica, como lo es el cedro rojo (*Cedrela odorata*), tomando en cuenta el trabajo interdisciplinario que se requiere para poder realizar dicha investigación.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Abdullah, A. & L. Grace. 1985. *In vitro adventitious shoot formation from embryonic and cotyledonary tissues of Pinus brutia Ten.* Plant Cell, Organ and Tissue Culture. 5: 35-44.
- Aimers-Halliday. 1992. *Clonal propagation and genetic testing of Virginia pine (Pinus virginiana Mill.)*. Ph. D. dissertation. Texas A. M. University, College Station, Texas. 124 p.
- Aitken-Chirtie, J., J. Horgan & T. Thorpe. 1981. *Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of Pinus radiata.* Can. J. of For. Res. 11(1):112-117.
- Arnold, S. 1988. *Tissue culture methods for clonal propagation of forest trees.* University of Agriculture Sciences. Dept. of Forest Genetics. No. 56. Pp. 2-13.
- Bidwell, R. 1980. *Fisiología Vegetal.* AGT editor. México. 784 p.
- Bonilla, G. 1999. *Diferenciación de brotes adventicios de Caoba.* Tesis de licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM. 75p.
- Bonga, J. & Aderkas V. 1992. *In vitro culture of trees.* Alemania. Ed Kluwer Academia. Publishers.
- Brown, L. & E. Sommer. 1980. *Application of tissue culture to forest tree improvement.* In WR Sharp, et al., eds; plant cell and tissue culture and applications. Ohio State Univ. Press. Columbus. Pp 461-491.
- Capó, M. & S. Sánchez. 1992. *Las actividades forestales y su impacto en el ecosistema.* Departamento forestal UAAAN y Colegio de Postgraduados, Chapingo. México. Pp 153-160.
- Chang, S., S. Sen, C. McKinley, J. Aimers-Halliday & R. Newton. 1991. *Clonal propagation of Virginia pine (Pinus virginiana Mill.) by organogenesis.* Plant cell reports 10:131-134.
- Devlin, R. 1982. *Fisiología vegetal.* Ediciones Omega. Barcelona. 517 p.

- Enriquez, J. 1985. *Propagación in vitro de cedro rojo (Cedrela odorata L.)*. Departamento de enseñanza, investigación y servicio en bosques. UACH. Tesis profesional (Ingeniero Agrónomo). México. Pp. 93.
- Estrada, A. 1988. *Producción de brotes e injertación in vitro en especies de nopal (Opuntia spp) originarias del altiplano potosino zacatecano*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Genética. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. Pp 160.
- García, D. 1991. *Regulación del crecimiento y desarrollo in vitro de estructuras reproductivas del sorgo (Sorghum bicolor L. Moench)*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 111 p.
- George, F. & D. Sherrington. 1984. *Plant propagation by Tissue Culture*. Handbook and Directory of Comercial Laboratories. Gran Bretaña. Editorial Exegetics Limited. 709 p.
- González, A. 1999. *Propagación in vitro de olivos (Olea europea)*. Tesis de licenciatura (Ingeniero Agrónomo). UAM-Xochimilco. 55p.
- Heller, R. 1953. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 14:1-22 in Mellor y Stace- Smith 1977.
- Hocker, H. 1984. *Introducción a la Biología Forestal*. A. G. I. Editor, S. A. México. Pp 54-57.
- Huang. 1993. *Applications of biotechnology and molecular genetics to tree improvement*. Journal of Arboriculture. 19(2):84-98.
- Hurtado, V. & E. Merino. 1994. *Cultivo de tejidos vegetales*. Trillas. México. 232p.
- INEGI. 1995. *Producción forestal de México*. VII Censo Agropecuario, 1991. Colegio de Postgraduados. México. 170 p.
- INEGI. 1997. *Explotación de pino en el estado de Durango*. México. 51 p.
- Jasso, J. & J. López. 1992. *El mejoramiento forestal en la conservación y reforestación de áreas forestales*. Colegio de Postgraduados. Chapingo. Edo. de México. Pp 203-230.

- Martínez, M. 1994. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de cultura económica. México. 397 p.
- Mott, R. & H. Amerson. 1981. *Tissue culture plantlets produced from Pinus monticola embryonic materials*. Forest Sci. 27(2):299-304.
- Muruyama, E., I. Kinoshita, K. Ishii, H. Shigenaga, K. Ohba & A. Saito. 1997. *Alginate-encapsulated technology for the propagation of the tropical forest trees: Cedrela odorata L., Guzuma crinita Mart. and Jacaranda momosaefolia D. Don*. Silvae Genética, 46(1): 17-23.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. Physiology plantarum. 15:473-497 pp.
- Newton, J., A. Marck-Swize, E. Magallanes-Cedeno, N. Dong, S. Sen & M. Chain. 1995. *Somatic embryogenesis in slash pine (Pinus elliottii Englem.)*. In: S. M. Jain, P. K. Gupta, and R. J. Newton (eds.). Somatic embryogenesis in woody plants. Volume III. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp 183-195.
- Niembro, R. 1990. *Arboles y arbustos útiles de México*. UCh. . Departamento de bosques. Chapingo, México. Limusa -Noriega editores. 206 p.
- Patiño, V., E. Díaz, R. Pacheco & J. Chávez. 1997. *Plantaciones comerciales de Cedrela odorata (Cedro rojo)*. INIFAP Sureste. La Floresta. México. 20 p.
- Rzedowski, J. 1984. *Vegetación de México*. Limusa. México. 397 p.
- San José, C. 1986. *Influencia de la situación del explante en la planta y del tamaño del tubo de cultivo en la multiplicación in vitro de Quercus robur L.* Phytom. 46(1):33-38.
- Sen, S., J. Aimers-Halliday, R. Mckinley & J. Newton. 1993. *In vitro micropropagation of Afghan pine*. Can. J. For. Res. 24:1248-1252.
- Shoyama, Y., Y. Sasaki, I. Nishioka & T. Suzaki. 1992. *Clonal propagation of oak (Quercus acutissima Carruth)*. Biotechnology in Agriculture and Forestry. 18:179-181.

- Sutter, E. 1988. *Regulation of Morphogenesis: A brief introduction*. Hort Science. 23(3):512-525.
- Sutter, E. 1989. *Sweetgum (Liquidambar styraciflua C.)*. Biotechnology in Agriculture and Forestry. De VPS. Vol 5. Trees II. Pp 287-299.
- Tautorus, T., L. Fowke & D. Dunstan. 1995. *Somatic embryogenesis in conifers*. Can. J. Bot. 69:1873-1899.
- Uribe, I. 1998. *Influencia de distintos antioxidantes sobre la brotación y crecimiento in vitro en ceiba (Ceiba pentandra)*. Tesis de Licenciatura. Fac. Química. UNAM. 69 p.
- Vargas, J. & A. Velázquez. 1992. *La deforestación y su contribución al desarrollo ambiental*. Programa forestal. Colegio de Postgraduados. Chapingo. México. Pp 141-152.
- Vargas, J. *et al.* 1997. *Manejo de recursos genéticos forestales*. Colegio de Postgraduados. Chapingo. México. 252 p.
- Villalobos, A. & T. Thorpe. 1983. *Aplicaciones del cultivo de tejidos en especies forestales*. Ciencia y Desarrollo. México. 51:43-59.
- Villalobos, A. & T. Thorpe. 1985. *La micropropagación: conceptos, metodología y resultados*. En fundamentos y aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura. Roca W. ed. Ciat. Colombia.
- Von Arnold, S. & T. Eriksson. 1981. *In vitro studies of adventitious shoot formation in Pinus cordata*. Canadian Journal of Botany. 59 (5): 870-874.
- Von Arnold, S. & Hakman. 1987. *Regulation of somatic embryo development in Picea abies by abscisic acid (ABA)*. J. Plant Physiol. 132:164-169.

ANEXOS

Anexo 1

Etapa III. Determinación de las combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento, antioxidante y fuente de carbono.

Ensayo 3

Tabla 13. Desviación estándar (D) y coeficiente de variación (CV) del número de brotes en cinco medios del MS.

Días	T8		T9		T10		T11		T12		T13	
	D	CV	D	CV	D	CV	D	CV	D	CV	D	CV
3	1.26	122.3	0.35	30.9	0.25	23.5	0	0	0	0	0	0
6	1.26	122.3	0.35	30.9	0.25	23.5	0	0	0	0	0	0
9	0.8	66.1	0.79	62.6	0.79	62.6	0.35	30.9	0	0	0	0
12	0.8	66.1	0.79	62.6	1.03	85.8	0.36	31.6	0	0	0	0
15	1.03	81.7	0.64	45	0	0	0.42	34.7	0	0	0	0
18	1.12	73.2	0.67	4.6	0	0	0.42	34.7	0	0	0	0
21	1.12	73.2	0.67	44.6	0	0	0.43	35.5	0	0	0	0
24	0.45	36	0.68	44.1	0	0	0.5	37.6	0	0	0.37	32.4
27	0.86	62.3	0.9	52.3	0	0	0.5	37.6	0	0	0.48	37.5
30	0.86	62.3	0.94	55.2	0	0	0.5	37.6	0	0	0.53	37.2
33	0.86	62.3	0.94	55.3	0	0	0.5	37.6	0	0	0.48	37.3
36	0.86	62.3	0.94	55.3	0	0	0.67	46.5	0	0	0.53	37.3

Tabla 14. Desviación estándar (D) y coeficiente de variación (CV) del tamaño de los brotes de cinco medios del MS.

Días	T8		T9		T10		T11		T12		T13	
	D	CV	D	CV	D	CV	D	CV	D	CV	D	CV
3	0.16	43.2	0.08	33.3	0.13	23.5	0	0	0	0	0	0
6	0.16	43.2	0.14	43.7	0.15	23.5	0	0	0	0	0	0
9	0.19	42.2	0.17	47.2	0.18	62.6	0.35	30.9	0	0	0	0
12	0.25	41.6	0.22	51.1	0.14	85.8	0.36	31.6	0	0	0	0
15	0.36	48.6	0.27	60	0.27	0	0.42	34.7	0	0	0	0
18	0.52	65	0.31	53.4	0.44	0	0.42	34.7	0	0	0	0
21	0.53	66.2	0.31	53.4	0.44	0	0.43	35.5	0	0	0	0
24	0.55	62.5	0.77	68.7	0.76	0	0.5	37.6	0	0	0.37	32.4
27	0.85	91.4	0.55	78.5	1.03	0	0.5	37.6	0	0	0.48	37.5
30	0.75	67.5	0.72	90	1.24	0	0.5	37.6	0	0	0.53	37.2
33	0.79	64.7	0.74	84	1.42	0	0.5	37.6	0	0	0.48	37.3
36	1.02	73.9	0.87	93.5	1.41	0	0.67	46.5	0	0	0.53	37.3

**ESTA TESTS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Ensayo 4

Tabla 15. Desviación estándar (D) y coeficiente de variación (CV) del número de brotes en seis medios del MS.

Días	T8		T9		T13		T14		T15		T16	
	D	CV	D	CV	D	CV	D	CV	D	CV	D	CV
3	1.26	122.3	0	0	0.31	28.2	2.39	122.4	0	0	0	0
6	1.26	122.3	0	0	1.06	70.6	2.16	100.8	0	0	0	0
9	0.8	66	0	0	1.41	70.5	2.47	116.5	0	0	0	0
12	0.8	66	0	0	1.5	70.7	2.6	113.5	0.51	45.1	0	0
15	1.03	81.7	0	0	1.53	72.1	2.63	112.8	0.77	64.1	0	0
18	1.12	73.2	0.26	24.3	1.53	72.1	2.66	112.2	0.57	47.1	0	0
21	1.12	73.2	0.26	24.3	1.53	72.1	2.66	112.2	0.57	47.1	0	0
24	0.45	36	0.26	24.3	1.68	96	2.54	112.8	0.57	47.1	0	0
27	0.86	62.3	0.26	24.3	1.06	70.7	2.47	116.5	0.59	45.3	0	0
30	0.86	62.3	0.26	24.3	1.59	98.1	2.41	120.5	0.59	45.3	0	0
33	0.86	62.3	0.26	24.3	1.06	70.6	3.08	102.6	0.81	66.9	0.94	72.3
36	0.86	62.3	0.26	24.3	0.49	36.8	3.49	109	0.59	45.3	0.94	72.3

Tabla 16. Desviación estándar (D) y coeficiente de variación del tamaño de los brotes en seis medios del MS.

Días	T8		T9		T13		T14		T15		T16	
	D	CV	D	CV	D	CV	D	CV	D	CV	D	CV
3	0.16	43.2	0.15	37.5	0.14	31.1	0.21	53.8	0.09	21.4	0.12	28.5
6	0.16	43.2	0.2	47.6	0.16	31.3	0.33	68.7	0.18	38.2	0.17	33.3
9	0.19	42.2	0.17	36.9	0.31	54.3	0.25	41.6	0.21	42	0.21	31.8
12	0.25	41.6	0.18	34.6	0.39	59	0.39	65	0.19	42.2	0.24	34.2
15	0.26	48.6	0.48	52.1	0.41	54.6	0.44	73.3	0.35	48.6	0.28	34.1
18	0.52	65	0.38	43.6	0.43	51.2	0.43	64.1	0.37	43.5	0.28	34.1
21	0.53	66.2	0.38	43.6	0.43	50.5	0.43	64.1	0.37	43.5	0.3	35.3
24	0.55	62.5	0.4	33	0.35	35	0.39	63.9	0.37	43.5	0.32	43.8
27	0.85	91.4	0.4	33	0.35	35	0.25	41.6	0.42	43.4	0.32	43.8
30	0.75	67.5	0.4	33.3	0.68	63.5	0.39	75	0.42	42.4	0.4	46.5
33	0.79	64.7	0.37	37.1	0.68	97.1	0.43	53.7	0.46	44.6	0.53	57.6
36	1.02	73.9	0.4	38.8	0.72	110.7	1.93	145.1	0.52	47.7	0.5	53.2

El coeficiente de variación y la desviación estándar se presentan en tabla porque son valores muy grandes que se salen de la escala de la gráfica.

Anexo 2

Medio MS * (Murashige y Skoog, 1962)

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACION		STOCK mML ⁻¹
		mgL ⁻¹	mML ⁻¹	
Solución I				
NH ₄ NO ₃	80.04	1650	20.6	2060
KNO ₃	101.108	1900	18.8	1880
Solución II				
MgSO ₄ *7H ₂ O	246.48	370	1.5	150
MnSO ₄ *H ₂ O	169.01	16.9	1x10 ⁻²	1
ZnSO ₄ *7H ₂ O	287.54	8.6	3x10 ⁻²	3
CuSO ₄ *5H ₂ O	249.68	2.5x10 ⁻²	1x10 ⁻²	1
Solución III				
CaCl ₂ *2H ₂ O	147.02	440	3	300
KI	166.01	0.83	5x10 ⁻³	5x10 ⁻¹
CoCl ₂	237.93	2.5x10 ⁻²	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻²
Solución IV				
KH ₂ PO ₄	136.09	170	1.25	125
H ₃ BO ₃	61.86	6.2	1x10 ⁻³	1x10 ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ *H ₂ O	241.95	2.5x10 ⁻¹	1x10 ⁻³	1x10 ⁻¹
Solución V				
FeSO ₄ *7H ₂ O	278.028	27.8	1x10 ⁻¹	10
EDTA*2H ₂ O	372.028	37.3	1x10 ⁻¹	10
Fuente de carbono				
Sacarosa	342.31	3x10 ⁴	87.63	

Medio Heller (1953).

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACION		STOCK
		mgL ⁻¹	mML ⁻¹	mML ⁻¹
Solución I				
NH ₄ NO ₃	85	600	7.05	705
Solución II				
MgSO ₄	246.48	250	1.014	101.42
MnSO ₄ *H ₂ O	169.01	7.6x10 ⁻²	4.5x10 ⁻⁴	4.5x10 ⁻²
ZnSO ₄ *7H ₂ O	287.54	1	3.47x10 ⁻³	3.4x10 ⁻¹
CuSO ₄ *5H ₂ O	249.68	3x10 ⁻²	1.2x10 ⁻⁴	1.2x10 ⁻²
Solución III				
MgCl ₂	95.22	2.1x10 ⁻²	2.2x10 ⁻⁴	2.2x10 ⁻²
CaCl ₂	237.93	4.7x10 ⁻²	1.97x10 ⁻⁴	1.97x10 ⁻²
KI	166.01	1x10 ⁻²	6.02x10 ⁻⁵	6.02x10 ⁻³
KCl	74.56	750	10.06	1006
Solución IV				
H ₃ PO ₄	61.86	1	1.6x10 ⁻²	1.6
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	137.99	125	0.905	90.58
Solución V				
FeCl ₂ *6H ₂ O	243.85	1	4.1x10 ⁻³	4.1x10 ⁻¹
Fuente de carbono				
Sacarosa	342.31	3x10 ⁴	87.63	

Vitaminas R-2

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACION		STOCK mML ⁻¹
		mgL ⁻¹	mML ⁻¹	
Mio-inositol	180.16	100	0.55	55.5
Tiamina	327.36	0.1	3.05×10^{-4}	3.05×10^{-2}
Acido nicotínico	123.11	.5	4.06×10^{-2}	0.406
Piridoxina HCl	205.64	0.5	2.43×10^{-2}	0.243

Reguladores de crecimiento

BAP	10 mg/100 ml disolver con 2 gotas de HCl 1N
2ip	10 mg/100 ml disolver con 2 gotas de HCl 1N
AG ₃	10 mg/100 ml disolver en agua tibia
AIB	10 mg/100 ml disolver con 2 gotas de NaOH 1N