



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CULTIVO *in vitro* DE *Cedrela odorata* L.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

AMARANTA ARELLANO RIVAS



DRA. TERESITA DEL NIÑO JESÚS MARÍN HERNÁNDEZ

2007



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.

FACULTAD DE CIENCIAS



División de Estudios Profesionales

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:
"Cultivo in vitro de Cedrela odorata L."

realizado por **Arellano Rivas Amaranta**

con número de cuenta **09804595-6**, quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a) Propietario **Dra. Teresita del Niño Jesús Marín Hernández**

Propietario **Dra. Hilda Susana Azpiroz Rivero**

Propietario **M. en C. Efraim Velasco Bautista**

Suplente **M. en C. Ma. del Pilar de la Garza López de Lara**

Suplente **Biól. Felipe Nepamuceno Martínez**

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 12 de Marzo
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE Biología

del 2007

Dr. Zenon Cano Santana

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología del CENID-COMEF del INIFAP bajo la dirección de la Dra. Teresita del Niño Jesús Marín Hernández

DEDICATORIA

A mis padres Flor y Fernando y a mi hermana Fernanda, quienes dieron el amor y cuidado que esta semilla necesitaba para germinar. Gracias por su apoyo e insistencia en este trabajo.

A mis abuelitos María de la Luz y Roberto. A mis tíos y primos.

A mis abuelitos Rebeca y Enrique. A mis tíos y primos.

A la gente del CENID-COMEF, por su calidez.

A Mabel Hernández por su apoyo constante en la realización de esta tesis y por su amistad.

A Vicente Sánchez Monsalve por todos sus consejos y porque sin importar la distancia me alentó constantemente para dar seguimiento a este trabajo.

A Ángeles Cancino Rodezno por contagiar su dinamismo y amor al trabajo.

A la gente del Campo Experimental “El Palmar” porque cada visita fue mágica.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Biotecnología y Germoplasma del CENID-COMEF, INIFAP por abrirme sus puertas y por ser como una segunda casa en este tiempo.

A la Dra. Tere Marín por esta oportunidad, por su asesoría y cariño.

A la Dra. Susana Azpiroz por la revisión de este trabajo y sus valiosas aportaciones. Por ser un ejemplo.

Al M. en C. Efraín Velasco por su infinita paciencia y apoyo en el análisis estadístico. Por cambiar mi percepción de los números.

A la M. en C. Pilar de la Garza por sus aportaciones a este trabajo y por su cariño.

Al Biólogo Felipe Nepamuceno por su revisión y aportaciones a esta tesis.

A Rodrigo por su compañía en este camino del cedro rojo.

A Alma por su cariño y compañía en el laboratorio y fuera de el.

A Edgardo Mendoza por su apoyo y compañía durante la labor experimental.

A Elizabeth y Ruth por su apoyo en los trámites.

Al Sr. Tomás Salcedo por llenar de música los experimentos de esta tesis.

A Laura Paz por alentarme.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias: Sinué, Esperanza, Paty, Iris, Itzel, Jaime, Ramcés y Ariana, porque siempre recordaré los momentos que vivimos juntos.

Yo lo pregunto

Yo Nezahualcóyotl lo pregunto:

¿Acaso de veras se vive con raíz en la tierra?

Nada es para siempre en la tierra:

Sólo un poco aquí.

Aunque sea de jade se quiebra,

Aunque sea de oro se rompe,

Aunque sea plumaje de quetzal se desgarra.

No para siempre en la tierra:

Sólo un poco aquí.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE CUADROS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	8
2. OBJETIVOS	10
3. ANTECEDENTES	11
3.1 Producción forestal maderable en México	11
3.2 <i>Cedrela odorata</i> L.	12
3.2.1 Ubicación taxonómica	12
3.2.2 Distribución	12
3.2.3 Descripción	13
3.2.4 Problemática	17
3.2.5 Plantaciones comerciales de cedro rojo	19
3.3 Propagación vegetativa	20
3.4 Cultivo in vitro	21
3.4.1 Morfogénesis	22
3.4.1.1 Embriogénesis	24
3.4.1.1.1 <i>Embriogénesis cigótica</i>	24
3.4.1.1.2 <i>Embriogénesis somática in vitro</i>	27
3.4.1.2 Organogénesis	31

3.4.1.3 Cultivo de ápices	32
3.4.2 Fitorreguladores	33
3.4.3 Contaminación	36
3.4.4 Oxidación	37
4. MATERIAL Y MÉTODOS	39
4.1 Embriogénesis somática <i>in vitro</i>	39
4.1.1 <i>Procedencia del material utilizado</i>	39
4.1.2 <i>Explantes</i>	39
4.1.3 <i>Obtención del material aséptico</i>	39
4.1.4 <i>Germinación</i>	40
4.1.5 <i>Antioxidantes</i>	41
4.1.6 <i>Formación de callo</i>	42
4.2 Cultivo de ápices para la obtención de planta	45
4.2.1 <i>Aclimatización</i>	45
4.3 Análisis estadístico	46
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1 Embriogénesis somática <i>in vitro</i>	48
5.1.1 <i>Obtención del material aséptico</i>	48
5.1.2 <i>Germinación</i>	50
5.1.3 <i>Antioxidantes</i>	51
5.1.4 <i>Formación de callo</i>	57
5.2 Cultivo de ápices para la obtención de planta	61
6. CONCLUSIONES	63
7. RECOMENDACIONES	64

8. ANEXOS	65
9. ABREVIATURAS	66
10. BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Diferencias entre embriogénesis somática y organogénesis.	32
Cuadro 2.	Tratamientos desinfectantes.	40
Cuadro 3.	Tratamientos antioxidantes en medio WPM.	41
Cuadro 4.	Tratamientos antioxidantes en medio B5.	41
Cuadro 5.	Tratamientos antioxidantes 2 en medio B5.	42
Cuadro 6.	Medios WPM y B5 para la inducción de callo.	42
Cuadro 7.	Tratamiento hormonal 0.	43
Cuadro 8.	Tratamientos hormonales 1-12.	43
Cuadro 9.	Tratamiento hormonal 13.	43
Cuadro 10.	Tratamientos hormonales para organogénesis.	45
Cuadro 11.	Estimaciones puntuales e intervalos de confianza al 95% para la proporción de semilla libre de contaminantes.	48
Cuadro 12.	Proporción de entrenudos no oxidados para los tratamientos libres de antioxidantes.	51
Cuadro 13.	Estimaciones puntuales e intervalos de confianza al 95 % para la proporción de entrenudos libres de oxidación en Medio WPM.	52

Cuadro 14.	Estimaciones puntuales y por intervalo de confianza al 95% para las proporciones de entrenudos libres de oxidación en medio B5.	54
Cuadro 15.	Estimaciones puntuales y por intervalos de confianza al 95 % para la proporción de entrenudos libres de oxidación para medio B5.	56
Cuadro 16.	Proporción de formación de brotes mediante tratamientos con kinetina.	61
Cuadro 17.	Proporción de formación de raíces mediante tratamientos con kinetina.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa Distribución de <i>Cedrela odorata</i> L.	13
Figura 2.	<i>Cedrela odorata</i> L.	15
Figura 3.	Plantación de <i>Cedrela odorata</i> en el Campo Experimental El Palmar, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.	16
Figura 4.	Frutos de cedro rojo	16
Figura 5.	Semillas de cedro rojo	16
Figura 6.	Larva de <i>Hypsipyla grandella</i> (Cibrián, 1995).	17
Figura 7.	Adulto de <i>Hypsipyla grandella</i> (Cibrián, 1995).	17
Figura 8.	Bifurcación del tronco de <i>Cedrela odorata</i> por el ataque del barrenador <i>Hypsipyla grandella</i> .	18

Figura 9.	Opciones biotecnológicas para la propagación de plantas que se originan a partir del cultivo de tejidos, en las que se incluyen también técnicas de modificación genética (George y Sherrington, 1984).	23
Figura 10.	Desarrollo de un embrión cigótico (Tykarska, 1979).	26
Figura 11.	Comparación entre la Embriogénesis Somática y la Embriogénesis cigótica (Zimmerman, 1993).	27
Figura 12.	Cantidades relativas de una auxina y una citocinina que son requeridas para dar origen a algunos tipos de morfogénesis (George y Sherrington, 1984).	35
Figura 13.	Plántula de <i>Cedrela odorata</i> L. en medio WPM, bajo condiciones de penumbra a los 22 días de siembra.	50
Figura 14.	Entrenado oxidado en medio B5 y b) Entrenado oxidado en medio WPM.	52
Figura 15.	Callos obtenidos a partir de sección de cotiledón de <i>Cedrela odorata</i> L. en medio líquido B5 con 9 μM de 2,4-D y 2.25 μM de kinetina: a) sección de callo y b) callo con protuberancias.	57
Figura 16.	Callo embriogénico: a) célula en activa división y b) célula del suspensor. B) Embrión globular: a) células de la cabeza embrionaria y b) células del suspensor.	59
Figura 17.	Embriones obtenidos a partir de secciones de cotiledón de <i>Cedrela odorata</i> L. en medio líquido B5 a las 2 semanas de retirados los fitorreguladores 2,4-D y kinetina: a), b) y c) embriones globulares, y d) embriones desprendidos del explante.	60
Figura 18.	Plántula de cedro a los 6 meses en medio WPM con 0.9 μM de kinetina: a) rebrotes, b) raíces y c) plantas de cedro con 1 año de edad obtenidas <i>in vitro</i> y aclimatizadas.	62

RESUMEN

Cedrela odorata L. presenta problemas de propagación y ataque del barrenador *Hypsipyla grandella*. Estas dificultades sugieren el empleo de herramientas biotecnológicas para hacer frente a la demanda comercial de la especie.

El objetivo central de este trabajo fue encontrar un método de propagación *in vitro* para el cedro rojo a través de diferentes concentraciones y combinaciones hormonales, en principio se establecieron, las condiciones asépticas para la siembra de semillas y obtención de explantes libres de patógenos.

Debido a los problemas de oxidación en los explantes para la inducción de embriones somáticos, se buscó disminuirla empleando los antioxidantes ácido ascórbico, ácido cítrico, polivinilpirrolidona 60 (PVP), carbón activado y combinaciones de estos.

El medio empleado para germinación fue Woody Plant (WPM). Para la inducción de embriogénesis somática se probaron los medios WPM y Gamborg (B5) suplementados con los aminoácidos L-glutamina, L-arginina e Hidrolizado de caseína y distintas concentraciones y combinaciones hormonales de 2,4-D y kinetina, además de sacarosa al 6%.

En el cultivo de ápices se empleó medio WPM con 2 concentraciones diferentes de kinetina.

El diseño experimental fue completamente al azar y los resultados obtenidos se analizaron mediante estimación puntual y de intervalo para el caso de desinfección y material no oxidado. A los datos obtenidos en el cultivo de ápices se les aplicó la prueba de proporciones binomiales.

El mejor tratamiento desinfectante fue la combinación de 500 mg l⁻¹ de Cuprimicín + alcohol al 70%, blanqueador comercial (Cloralex) al 20% +

0.01% de Tween 80 y enjuague por 2 horas en 1 ml de PPM/ 100 ml de agua destilada estéril.

La oxidación se redujo en un 45% al emplear 1 g l^{-1} de PVP.

La formación de embriones se obtuvo en medio B5 con $9 \text{ } \mu\text{M}$ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y $2.25 \text{ } \mu\text{M}$ de kinetina.

En el cultivo de ápices no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con 0.9 y $1.125 \text{ } \mu\text{M}$ de kinetina para la formación de brotes y raíces respectivamente.

Se recomienda variar las concentraciones de la combinación 2,4-D y kinetina para la inducción de embriogénesis somática.

1. INTRODUCCIÓN

Los recursos forestales de México han sufrido un gran deterioro, en las últimas décadas vastas extensiones de bosques y selvas han visto mermadas sus riquezas naturales, a tal grado que en algunas zonas se considera irreversible el daño ocasionado por diversos factores tales como: la extracción inmoderada de madera, plagas, enfermedades e incendios forestales; así como la presión que han ejercido sobre las masas forestales algunas actividades productivas, como la agricultura y la ganadería, además del crecimiento demográfico en las ciudades, que obliga a abrir nuevos espacios para habitación (CONAFOR, 2005).

Cerdrela odorata L. recibe considerable atención debido al alto valor comercial de su madera, considerada preciosa, a sus adecuadas propiedades físico-mecánicas, y a su resistencia al ataque de termitas (Riveros, 1998; Muñoz, 2003).

Su importancia comercial y el impacto negativo en sus poblaciones aunado a los problemas de propagación y el ataque del lepidóptero *Hypsipyla grandella* Zeller sugiere el empleo de técnicas como el *cultivo in vitro* que resulta una excelente alternativa por los múltiples beneficios que brinda.

Solamente unas cuantas especies desarrolladas a través del cultivo de tejidos (CTV) han podido ser explotadas comercialmente o usadas para programas de reforestación. Esta carencia de protocolos es porque la propagación a través del CTV requiere de condiciones particulares para cada especie y un largo proceso de aclimatización en campo. (Gupta & Agrawal, 1992).

El CTV permite en relación a los métodos tradicionales de propagación, ofrece ventajas tales como: a) la multiplicación de grandes cantidades de plantas en espacios reducidos, poco tiempo y a un menor costo, b) control de la sanidad del material propagado, c) transporte

internacional del material vegetal *in vitro* con menos restricciones fitosanitarias, entre otras.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

- Desarrollar una metodología de propagación para *Cedrela odorata* L. a través de embriogénesis somática y el cultivo de ápices.

Objetivos específicos

- Determinar un método de desinfección para el cultivo *in vitro* de semillas de *C. odorata* L.
- Determinar el antioxidante más efectivo para el cultivo *in vitro* de *C. odorata* L.
- Determinar los efectos de distintas concentraciones de los fitorreguladores 2,4-D y kinetina para la inducción de callos embriogénicos.
- Establecer los requerimientos básicos para el cultivo de ápices de *Cedrela odorata* L.

3. ANTECEDENTES

3.1 Producción forestal maderable en México

La producción forestal maderable del año 2004 alcanzó un volumen de 6.7 millones de m³r y el 5.7% estuvo representado por especies tropicales (SEMARNAT, 2004).

Veracruz produjo 12,256 m³r de maderas preciosas. La producción forestal se lleva a cabo principalmente en terrenos ejidales, con los terrenos privados en segundo lugar y los de unidades mixtas (INEGI, 1995; Ruíz, 2000).

Dentro de las maderas preciosas después de la caoba, *Cedrela odorata* L. (cedro rojo), es la especie maderable tropical más importante en la industria forestal de México. Su madera de excelentes características, se usa para obtener vigas, tablas y chapas, así como para fabricar artículos torneados, para cajas de puros y para hacer tallas. El uso más indicado para esta especie, por el bello jaspeado de su madera, es la fabricación de chapas y madera terciada para la exportación (Pennington y Sarukhán, 1998).

El aprovechamiento y el uso de la gran diversidad, de maderas de especies 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 el sureste de México. Las especies económicamente más importantes en esta región son caoba, cedro, chacáh, chechem, chicozapote, ébano, guanacaste, mangle y pukté. (INEGI, 1997).

3.2 *Cedrela odorata* Linnaeus (cedro rojo)

3.2.1 Ubicación taxonómica

Reino: Plantae

Subreino: Tracheophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Meliaceae

Género: *Cedrela*

Especie: *Cedrela odorata* L.

3.2.2 Distribución

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).

Alcanza sus máximos tamaños e incrementos en zonas con precipitaciones entre 2500 y 4000mm anuales; en zonas con precipitación pluvial mucho menor el árbol no se desarrolla correctamente y presenta fustes cortos y torcidos (Pennington y Sarukhán, 1998).

Especie poco dominante y poco abundante en las Selva altas y medianas (Sánchez *et al.*, 2006). Se encuentra en la vertiente del Golfo desde el sur de Tamaulipas y sureste de San Luis Potosí hasta la Península de Yucatán y en la del Pacífico desde Sinaloa hasta Guerrero y en la Depresión Central y la costa de Chiapas (Pennington y Sarukhán, 1998) (Figura 1).



Figura 1. Mapa Distribución de *Cedrela odorata* L.

3.2.3 Descripción (Pennington y Sarukhán, 1998)

C. odorata L. es un **árbol** de hasta 35 m de altura total y DN de hasta 1.7 m, el tronco forma a veces pequeños contrafuertes poco prominentes, ramas ascendentes y gruesas, copa redondeada y densa.

La **corteza externa** está ampliamente fisurada con las costillas escamosas, pardo grisácea a moreno rojiza. La **corteza interna** es rosada y cambia de pardo amarillenta, fibrosa y amarga. El grosor total de la corteza alcanza hasta 20 mm.

La **madera** de esta especie tiene una albura de color crema rosado con un olor muy característico y sabor amargo, con vasos grandes dispuestos en anillos concéntricos y bandas conspicuas y espaciadas de parénquima apotraqueal.

Las ramas jóvenes van de color pardo a moreno grisáceas, glabras o finamente pubescentes, con lenticelas redondeadas y protuberantes, del mismo color que la rama (Figura 3).

Las **hojas** presentan yemas de 3 a 5 mm de largo, ovoides, agudas, rodeadas por varias escamas ovadas y pubescentes. **Estípulas** ausentes. Hojas dispuestas en espiral, paripinnadas o imparipinnadas, de 15 a 50 cm incluyendo pecíolo, compuestas por 10 a 22 **folíolos** opuestos o alternos, de 4.5 x 2 a 14 x 4.5 cm lanceolados u oblongos asimétricos, con el margen entero, ápice acuminado, base muy asimétrica, una mitad redondeada y la otra aguda (Figura 2); de color verde oscuro en el haz y verde pálido o verde amarillento en el envés; glabros; nervación amarillenta en el envés; pecíolos amarillentos, pulvinados; **peciólulos** de 4 a 15 mm, pubescentes o glabros, pulvinados; las hojas poseen un penetrante olor a ajo cuando se estrujan. Los árboles de esta especie tiran hojas cuando han madurado totalmente los frutos de la temporada anterior, antes de florecer.

Flores masculinas y femeninas en la misma inflorescencia, es decir, monoica. Dispuestas en panículas terminales de 15 a 30 cm de largo, finalmente pubescentes; pedicelos de 1 a 2 mm de largo; flores suavemente perfumadas, actinomorfas; masculinas con el cáliz verdoso de 2 a 3 mm de largo, infundibuliforme o anchamente tubular, con 5 dientes agudos, pequeños y desiguales, ciliolados; corola crema verdoso, tubular en la prefloración, que se abre en 5 pétalos, 7 a 8 mm de largo, lineares, con el ápice agudo o redondeado, con una proyección aplanada en la superficie interior cerca de la base, la cual entra en uno de los surcos del ginóforo, imbricados, pubescentes en ambas superficies; estambres 5, de 2 a 3 mm de largo, insertos cerca del ápice del ginóforo, glabros; anteras de 1.5 mm de largo; ovario situado sobre un ginóforo alargado y longitudinalmente de apenas al de los estambres, glabro; estigma verde, grande, truncado. Flores femeninas

parecidas a las masculinas, pero con las anteras abortivas, sin polen, y el ovario hinchado. Florece de mayo a agosto.

Los **frutos** (Figuras 2 y 4) se ubican en infrutescencias de hasta 30 cm, péndulas. Cápsulas de 2.5 a 5 cm de largo, 4 a 5 valvadas, elipsoides a oblongas, pardo verdoso a moreno con numerosos grupos de lenticelas pálidas, glabras, con un fuerte olor a ajo y que producen un exudado blanquecino y acuoso cuando están inmaduras; contienen alrededor de 30 semillas aladas de 2 a 2.5 cm incluyendo el ala, morenas (Figura 5).

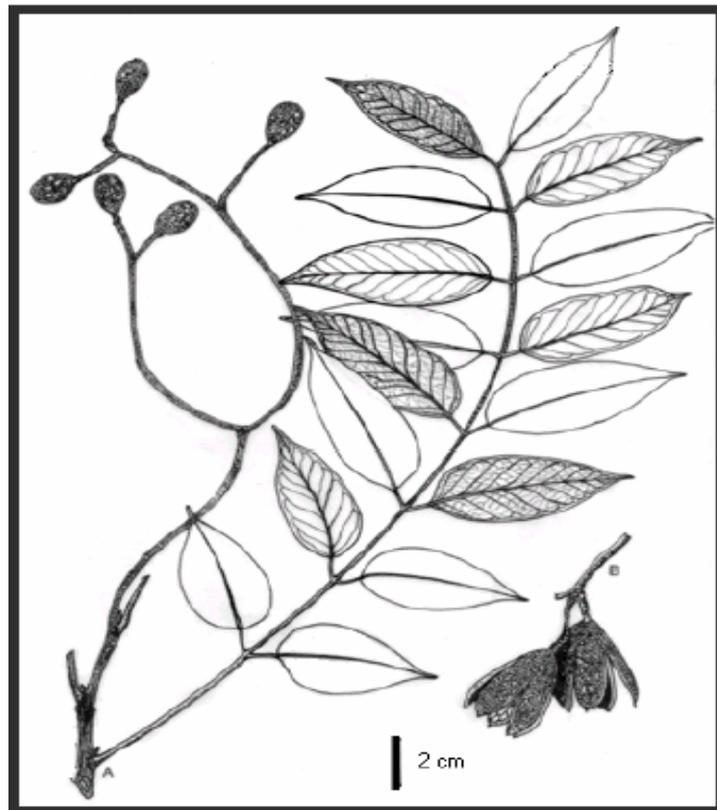


Figura 2. *Cedrela odorata* L.

Fuente: InBio, Álvaro Fernández, 1997.



Figuras 3. Plantación de *Cedrela odorata* en el Campo Experimental El Palmar, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias y 4. Frutos de cedro rojo.

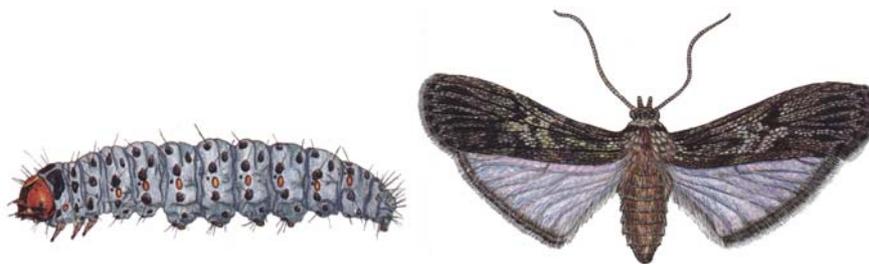


Figura 5. Semillas de cedro rojo.

3.2.4 Problemática

El cedro rojo junto con la caoba, *Swietenia macrophylla* King han sufrido la disminución del tamaño de sus poblaciones (número de individuos) debido a diversos factores, resaltando entre ellos los procesos de deforestación y el aprovechamiento selectivo sobre los mejores individuos, afectando la constitución genética de las poblaciones (Patiño, 1997).

Aunado a este problema, el deterioro se agrava por el ataque del barrenador de las meliáceas (*Hypsipyla grandella* Zeller) (Figuras 6 y 7), asociado a metabolitos secundarios que producen estas especies atrayendo a que el insecto ovoposite en los brotes (Soares, 2003); la larva de esta mariposa se alimenta de la yema apical destruyéndola; su acción produce deformaciones y bifurcación del tronco (Figura 8) retrasando considerablemente el crecimiento de la planta afectada y ocasionalmente puede causar la muerte. *Hypsipyla grandella* pertenece a la familia Pyralidae, orden Lepidoptera. Según Herrera y Lanuza, 1997, el barrenador impide la formación de fustes rectos, disminuyendo el valor comercial del árbol; además retarda el crecimiento y, si los ataques son repetidos en plántulas o árboles jóvenes, puede causar la muerte. Además afecta los frutos dificultando su reproducción.



Figuras 6 y 7. Larva y adulto de *Hypsipyla grandella* (Cibrián, 1995).



Figura 8. Bifurcación del tronco de *Cedrela odorata* por el ataque del barrenador *Hypsipyla grandella*.

Según Quevedo (1995) se puede encontrar un efecto benéfico del ataque de *Hypsipyla*; cuando la planta logra una altura de 6 a 7 m, el ataque se localiza en las yemas laterales, actuando como un predador natural, lo que ayuda a la planta a adquirir un mayor fuste sin nudosidades (Muñoz, 2003).

Afortunadamente, aún es posible encontrar una gran variabilidad genética de la especie (Navarro y Vázquez, 1986), la cual es muy útil en programas de mejoramiento genético, así como en los ensayos de propagación vegetativa utilizando técnicas de cultivo de tejidos, en busca de nuevas posibilidades para resolver los problemas planteados (Pérez *et al.* 2002)

3.2.5 Plantaciones comerciales de cedro rojo

Actualmente, en México, casi todos los productores que establecen plantaciones forestales de tipo comercial cuentan con apoyo de la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) a través del Programa para el Desarrollo de Plantaciones Forestales Comerciales (PRODEPLAN), es así que del año 1997, y hasta finales de 2006, se han asignado apoyos para una superficie aproximada de 124,000 hectáreas de plantaciones de cedro rojo puras o mezcladas con otras como: teca, melina y caoba, en arreglos en forma de ajedrez (Monreal, 2007).

El monto de los apoyos asignados asciende a más de 800 millones de pesos; de la superficie comprometida se han establecido, a la fecha alrededor de 40,000 has.

Se puede considerar que de las 124,000 has que suma el total de los proyectos que contemplan la plantación con cedro rojo, el 70% de la superficie a plantar corresponde a *C. odorata*, por lo cual la superficie correspondiente asciende a 87,000 has.

Esta superficie se va a establecer a un ritmo aproximado de 10,000 a 12,000 has por año. Los principales estados donde se está plantando cedro rojo son: Veracruz, Oaxaca, Campeche, Tabasco, Quintana Roo, Chiapas, Tamaulipas y Yucatán.

Para las primeras plantaciones de cedro rojo, apoyadas por PRODEPLAN-SEMARNAT-CONAFOR, que se establecieron en 1997, se estima que las primeras cortas de aclareo comercial se darán en este año 2007, mientras que la cosecha final se iniciará entre los años 2015 y 2018.

Actualmente no hay existencias volumétricas de estas plantaciones porque aún están en desarrollo, aunque se espera que a los 20 años de edad de cada plantación, se logre un volumen de 200 m³ por ha. Con ello, en las 10,000 ha que se plantan cada año, se van a producir del orden de 2,000,000 m³ de madera en rollo, volumen que se cortará cada

año conforme las superficies sucesivamente plantadas vayan entrando en producción (Monreal, 2007).

3.3 Propagación vegetativa

La propagación vegetativa mediante macropropagación involucra el uso de métodos convencionales tales como injertos, acodos o enraizado de estacas. Mediante estas técnicas ha sido posible la producción masiva de clones en algunas especies forestales (Ruíz, 2000).

Injerto: la técnica de injerto consiste en tomar un segmento de una planta, por lo general leñosa, e introducirlo en el tallo o rama de otra planta de la misma especie o de una especie muy cercana, con el fin de que se establezca continuidad en los flujos de savia bruta y savia elaborada, entre el tallo receptor y el injertado. De esta manera, el tallo injertado forma un tejido de cicatrización junto con el tallo receptor y queda perfectamente integrado a éste, pudiendo reiniciar su crecimiento y producir hojas, ramas y hasta órganos reproductivos (Vázquez *et al.*, 1997).

Acodos: es una forma de estacado en la cual las raíces adventicias son iniciadas sobre un tallo al cual es sujetado la planta. El tallo enraizado (acodo) es separado, transplantado, y finalmente se obtiene una planta con sus propias raíces (Hartman *et al.*, 1997).

Estacas: Esta técnica de propagación tiene muchas ventajas y se emplea exitosamente sin necesidad de gran inversión económica. La técnica más común es la inducción de la formación de raíces en una sección del tallo o de la rama, de manera que se origine una planta independiente (Vázquez *et al.*, 1997).

3.4 Cultivo *in vitro*

El origen del cultivo de tejidos se remonta a 1902 con los intentos realizados por Haberlandt de cultivar células aisladas de plantas.

Es él quien postuló el principio de totipotencialidad celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas de cultivo *in vitro*.

Las herramientas necesarias que hicieron posible el avance de estas técnicas, tales como el desarrollo de los medios de cultivo y el conocimiento de los reguladores de crecimiento, estuvieron disponibles hasta finales de los años 50 (Jiménez, 1998).

El cultivo *in vitro* puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales (Jiménez, 1998).

Esta técnica tiene diversas aplicaciones:

- Estudios sobre fisiología y bioquímica vegetal.
- Estudios ontogenéticos.
- Obtención de plantas libres de patógenos.
- Propagación masiva (micropropagación).
- Conservación de germoplasma.
- Producción de metabolitos secundarios.
- Mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro*.
- Ingeniería genética.

Las principales ventajas de este sistema de propagación en comparación con las técnicas tradicionales de propagación vegetativa se pueden resumir en:

- Altos coeficientes de multiplicación que permiten manipular volúmenes elevados de plantas en cortos periodos de tiempo.
- Introducción rápida de nuevas variedades o clones.
- Producción independiente de condiciones ambientales.
- Uniformidad de plantas producidas.
- Mayor facilidad de comercialización.

- Intercambio internacional.
- Producción de especies ornamentales.

3.4.1 Morfogénesis

Órganos como tallos, hojas y flores pueden ser inducidos de forma adventicia mediante el cultivo de tejidos vegetales.

La creación de una nueva forma de organización, donde previamente no la había, se denomina morfogénesis u organogénesis. Mediante esta es posible obtener *de novo*:

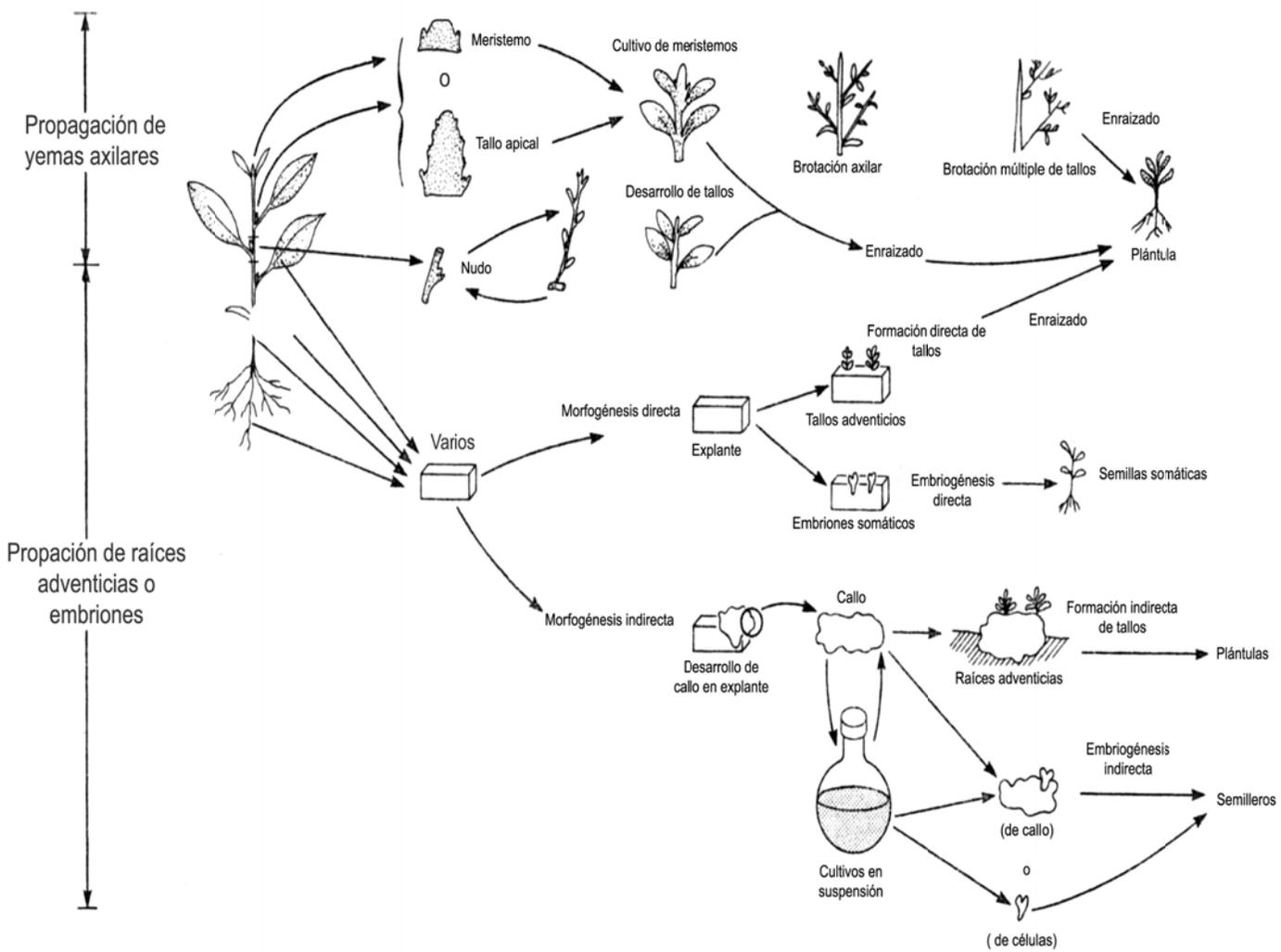
- Caulogénesis (formación de tallos) y rizogénesis (formación de raíces) de forma separada;
- Embriogénesis somática: formación de embriones a partir de tejidos indiferenciados y estructuralmente similares a los embriones que se encuentran en las semillas verdaderas.
- Flores o partes del perianto (ocurre sólo bajo circunstancias especiales).

Tallos, raíces y embriones somáticos (Figura 9) se originan de forma directa o indirecta (Hicks, 1980) a partir de células individuales o grupos de células los cuales son inducidos por las condiciones en que se cultivan para ser centros de una activa división celular (meristemas), cada uno capaz de producir un órgano en particular (George y Sherrington, 1984).

3.4.1.1.1 Embriogénesis Cigótica

3.4.1.1 EMBRIOGÉNESIS

Figura 9. Opciones biotecnológicas para la propagación de plantas que se originan a partir del cultivo de tejidos, en las que se incluyen también técnicas de modificación genética (George y Sherrington, 1984).



La embriogénesis inicia con el cigoto y su paso a través de una secuencia de de estadios característicos (Figura 10). Así mismo, ocurre una morfogénesis considerable después de la germinación de la semilla, la fase embriónica es tan crucial en ésta como cuando los meristemas y el patrón tallo-raíz son determinados (von Arnold *et al.*, 2001).

Etapas durante el desarrollo del embrión

El desarrollo del embrión puede ser dividido en dos importantes etapas (Dodeman *et al.*, 1997; von Arnold *et al.*, 2001).

1) Embriogénesis *sensu stricto*

En angiospermas, el desarrollo inicia con el cigoto y finaliza con el estado cotiledonario (Figura 9). El desarrollo puede ser dividido en una secuencia de diferentes estadios representando tres grandes eventos según Goldber *et al.*, (1994):

Cigoto

- División asimétrica del cigoto, dando como resultado una pequeña célula apical y una larga célula basal. La **célula apical** produce el embrión y la célula basal da origen al suspensor.
- La primera división que efectúa el embrión propiamente, es longitudinal. El suspensor es dividido transversalmente.
- El embrión de **dos células** sufre otra división longitudinal, perpendicular al plano de la división previa, así produce un embrión de **cuatro células**. El suspensor presenta divisiones transversales adicionales.
- Los cuatro cuadrantes son divididos transversalmente para producir un embrión de **ocho células**.
- Las células de la etapa anterior son divididas por hendiduras paralelas a la superficie para formar un embrión con **dieciséis células**, enmarcando aparte el **protodermo**.

Embrión globular

- Formación de un diseño específico, el cual toma lugar en el **embrión globular**. Las células del protodermo presentan divisiones perpendiculares a la superficie. Las células internas del embrión sufren divisiones longitudinales adicionales. La célula más próxima del suspensor es dividida transversalmente para producir la **hipófisis**.
- Las células de la hipófisis se dividen longitudinalmente y las células del interior se dividen longitudinal y transversalmente al mismo tiempo que las células del protodermo continúan dividiéndose.
- Las divisiones paralelas de las células de la superficie indican la emergencia de los **primordios cotiledonarios** como polo apical al mismo tiempo que el embrión comienza a ampliarse. El desarrollo del **procambium** es visible como células elongadas en el centro del embrión.

Estadio de corazón

- Los lóbulos cotiledonares continúan alargándose, haciendo que el cambio a simetría bilateral sea más obvio.
- Transición al estado cotiledonario el cual coincide con la iniciación del primordio de la raíz seguido, en dicotiledóneas, por el primordio del tallo (Tykarska, 1976, 1979; West y Harada, 1993).

2) Maduración del embrión seguida de la germinación.

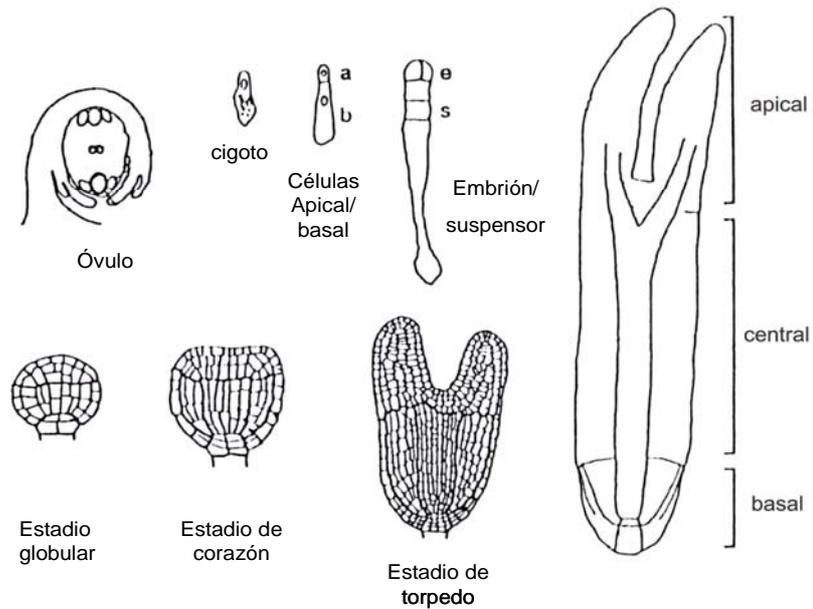


Figura 10. Desarrollo de un embrión cigótico (Tykarska, 1979).

La embriogénesis cigótica y la embriogénesis somática *in vitro* pasan por etapas muy similares en sus estados tempranos de desarrollo (Figura 11), pero en los estados finales los resultados son diferentes. En la primera, el resultado es una semilla, que si bien contiene una plántula potencial, es una entidad con objetivos y características bien definidas. En la segunda, el resultado es la producción directa de un embrión sin cubierta seminal y con el genotipo de la planta madre, formando así un clon (Rodríguez *et al.*, 1996).

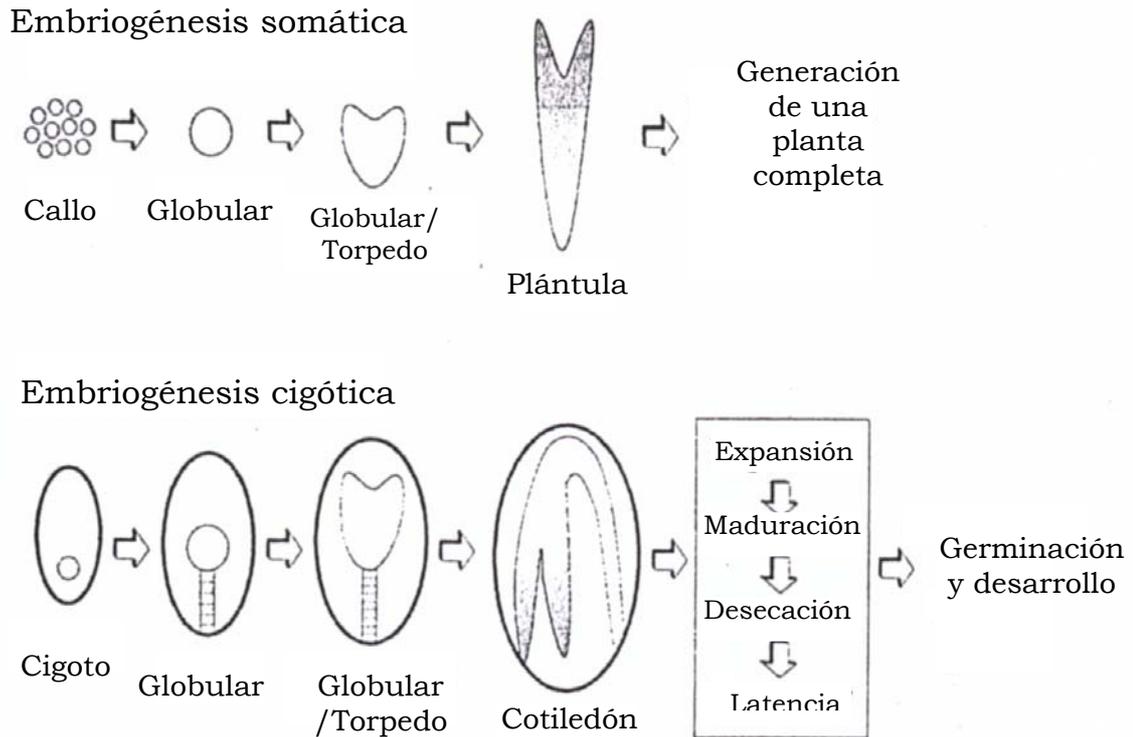


Figura 11. Comparación entre la Embriogénesis Somática y la Embriogénesis cigótica (Zimmerman, 1993).

3.4.1.1.2 Embriogénesis somática *in vitro*

Se ha definido como embriones somáticos, asexuales o adventicios los iniciados a partir de células que no son el producto de fusión de gametos (Tisserat *et al*, 1979). Según Litz y Jarret (1991), los embriones somáticos son estructuras bipolares, que tienen un eje apical-radical, aislados por un tejido epidérmico y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares deben ser capaces de crecer y formar plantas normales (Jiménez, 1998).

La embriogénesis somática no es un proceso que suceda únicamente en los cultivos *in vitro*, de hecho es relativamente común en algunas familias de plantas y se conoce como *apomixis* (Kiran y Thorpe, 1995).

Para que una célula vegetal lleve a cabo el proceso de embriogénesis somática debe estar “determinada” o “inducida”. Por lo anterior, las células capaces de formar embriones somáticos reciben el nombre de células embriogénicas determinadas (CED) o células proembriogénicas.

Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*:

Embriogénesis Somática Directa (ESD). Ésta ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callo. Este desarrollo directo es producto de la función realizada por la composición del medio de cultivo y el origen del explante (Jiménez, 1998).

Embriogénesis Somática Indirecta (ESI). En un primer paso, es indispensable obtener un tejido calloso o bien una suspensión celular embriogénica a partir de la cual se obtiene la diferenciación de embriones somáticos en un segundo paso.

El proceso de embriogénesis somática consta de varias etapas, en cada una de las cuales se requieren diferentes estímulos y ocurren fenómenos distintos (Merkle *et al.*, 1995).

Inducción: es el proceso de conversión de una célula somática en una proembriogénica. Se considera que los factores determinantes para que suceda el proceso de inducción son:

- a) Genotipo. Se sabe que diferentes genotipos aún de la misma especie muestran diferencias notables en la capacidad para activar elementos clave que se requieren para iniciar el proceso de embriogénesis somática.

- b) Grado de diferenciación. La ES es mucho más factible en tejidos jóvenes muy poco diferenciados, y prácticamente imposible en tejidos maduros completamente diferenciados.
- c) Auxinas. La presencia de estos reguladores de crecimiento es determinante para que ocurra el fenómeno de inducción. Se sabe que estimula entre otras cosas la metilación del ADN, lo cual puede favorecer el cambio de patrón de la expresión genética. Entre las auxinas más efectivas, se encuentran las sintéticas, como los ácidos fenoxiacéticos (2,4-D, ácido clorofenoxiacético y 2,4,5-T). Esto se debe a que las células vegetales no tienen la capacidad de degradar o inactivar de manera eficiente las auxinas sintéticas como lo hacen con las naturales, por lo que sus efectos son más intensos y duraderos. Santarem (1997) reporta el uso de 40mg/L de 2,4-D para la obtención de embriones somáticos en *Glycine max* (L.) Merrill.
- d) Aislamiento celular. Se sabe que el aislamiento de una célula o grupo de células con respecto al resto del tejido estimula también la inducción o conversión de una célula somática a proembriogénica.
- e) La adición de aminoácidos como: L-arginina, L-glutamina, L-alanina, L-metionina y L-asparagina como fuentes de nitrógeno al medio de cultivo influye radicalmente en el contenido de proteínas del embrión (Murray, 1988).
- f) Cantidad de sacarosa. Una alta concentración de sacarosa (6% m/v) puede favorecer la inducción del desarrollo de los embriones somáticos. Aunque esto no puede ser generalizado para todas las especies ya que, por ejemplo, en *Manihot esculenta* Crantz una elevada concentración de sacarosa tuvo efecto inhibitorio en la inducción de embriones (Konan *et al.*, 1992).

Histodiferenciación: las masa de células proembriogénicas se diferencian formando embriones somáticos, mediante una división y diferenciación celular simultáneas. Para que estas células pasen a una etapa de diferenciación se requiere de la disminución o eliminación de

las auxinas exógenas. Durante esta etapa se establece una polaridad de las masas de células proembriónicas, misma que se mantendrá durante todo el desarrollo del embrión.

En la histodiferenciación, los embriones somáticos pasan por una serie de estadios intermedios muy similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica. En las dicotiledóneas son: globular, corazón y torpedo, mientras que en las monocotiledóneas son: globular, coleoptilar y escutelar (Merkle *et al.*, 1995).

Maduración. Para que un embrión en el estadio de torpedo pueda germinar, se requiere de esta fase, durante la cual ocurre básicamente una elongación celular y división. El ácido abscísico y la reducción en el potencial osmótico hacen posible que ocurra esto (Von Arnold *et al.*, 2002).

Germinación. Es el proceso de elongación y reactivación metabólica de un embrión somático maduro para convertirse en una plántula. Para que esto suceda, se requieren estímulos como la luz, el ácido giberélico o citocininas (Merkle *et al.*, 1995).

Doble tinción

En angiospermas el cigoto (producto de la fusión de gametos) se divide transversalmente para formar una célula apical o terminal. La célula apical que usualmente es más pequeña que la basal, es densa y con una intensa actividad de síntesis de ADN, detectable por medio de compuestos como el acetocarmín y el naranja de acridina, que tiñen el material genético. Esta célula apical es la que a través de divisiones ordenadas dará lugar a la cabeza embrional que finalmente se convertirá en una nueva planta.

La célula basal es generalmente más grande que la apical y es altamente vacuolada, dando la impresión de que es una célula vacía e inactiva. La célula basal puede llegar a pasar por pocas divisiones

celulares para formar el sistema “suspensor” del embrión (Rodríguez *et al.*, 1996).

3.4.1.2 Organogénesis

La organogénesis es un evento morfogénético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido materno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el subsecuente enraizamiento final. El control de la organogénesis está dado principalmente por la acción de auxinas y citocininas (Jiménez, 1998).

Organogénesis directa. En este tipo de organogénesis, la formación de brotes o raíces se da directamente en el explante inicial sin la previa formación de callo.

La ausencia de callo en los explantes da un alto porcentaje de seguridad de que los brotes producidos sean idénticos a la planta madre, siendo por esto un medio de propagación comercial adecuado (Rodríguez *et al.*, 1996).

Organogénesis indirecta. Los brotes se forman a partir de callos (Jiménez, 1998). Esta forma de propagación clonal no es recomendable para fines comerciales, ya que existe una gran probabilidad de que se produzca variación genética, también llamada variación somaclonal.

Cuadro 1. Diferencias entre embriogénesis somática y organogénesis

Proceso	Diferencias
---------	-------------

<p>Embriogénesis somática</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Evento morfogénético con desarrollo bipolar. - Sin conexión vascular con el tejido materno.
<p>Organogénesis</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Evento morfogénético que se caracteriza por su desarrollo unipolar. - Con conexión vascular entre los nuevos brotes y el tejido materno. - En contraste con la embriogénesis somática, en la vía organogénica para lograr la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos medios que favorecen el desarrollo de los brotes inhiben la formación de raíces y viceversa.

3.4.1.3 Cultivo de ápices

Los meristemos apicales y axilares (contenidos dentro de las llamadas yemas), al ser de manera natural los puntos de crecimiento en los vegetales tienen la capacidad de formar nuevos brotes. Esa capacidad natural la mantienen cuando se cultivan *in vitro*. Debido a lo anterior, el cultivo de yemas apicales o axilares es una manera sencilla de obtener nuevos brotes, los cuales pueden enraizar y producir así nuevas plantas. Este sistema de propagación se basa, por lo tanto, en la formación de nuevos brotes a partir de meristemos preexistentes, por lo que no implica fenómenos de dediferenciación y rediferenciación celular como los que ocurren en la organogénesis y en la embriogénesis somática. (CINVESTAV, 1997).

Para el cultivo de ápices, se toman explantes apicales de 4-10 mm de longitud, los cuales contienen además del meristemo, varios primordios foliares así como el tejido vascular diferenciado (Jiménez, 1998).

3.4.2 Fitorreguladores

Las plantas presentan en sus tejidos, sustancias endógenas que tienen una función reguladora en el crecimiento y desarrollo (Figura 11); estos compuestos que son regularmente activos a bajas concentraciones, son conocidos como reguladores del 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 (Ruíz, 2000).

Los fitorreguladores 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 (Uribe, 1998). Entre las principales se encuentran:

- 2,4-D ácido diclorofenoxiacético
- AIA Ácido indolacético
- AIB ácido indolbutírico
- ANA ácido naftalenacético

Son ampliamente usadas en los trabajos de micropropagación y son incorporadas en el medio nutritivo para promover el desarrollo de callo, células en suspensión como lo menciona Liu *et al.* 2001 para *Ipomoea batatas* L., u órganos (como algunos meristemos de tallos y raíces) y para regular la morfogénesis especialmente en conjunción con las citocininas.

Las **citocininas** promueven la división celular, inducen la formación de brotes adventicios, controlan la dominancia apical y la morfogénesis de explantes *in vitro* (Uribe, 1998). Las más usadas son:

- BAP 6-bencilaminopurina
- Kinetina

- 2ip-isopentiladenina
- Zeatina

El crecimiento y la morfogénesis *in vitro* son reguladas por la interacción y balance entre los fitorreguladores adicionados al medio y las hormonas producidas de forma endógena por las células cultivadas.

En 1957, Skoog y Millar encontraron que, al variar los niveles de auxinas y citocininas en el medio de crecimiento, diversos aspectos de la diferenciación celular y organogénesis en los tejidos y órganos cultivados podían ser controlados (Figura 12).

Un nivel elevado de auxina en relación a una baja concentración de citocinina será necesario para la rizogénesis.

Así mismo, el proceso de embriogénesis somática es iniciado en un medio nutritivo que contenga altos niveles de estos fitorreguladores, en particular 2,4-D como lo indica Tang et al. (2001) para la obtención de embriones de *Pinus taeda* L.

Para la inducción de callo en dicotiledóneas es necesaria la incorporación de auxinas y citocininas en el medio. Das y Raychaudhuri (2001), reportan cultivos de callo embriogénico de *Plantado ovata* Forks., al emplear combinaciones de 2,4-D y kinetina en el medio de cultivo.

Sin embargo los callos o cultivos en suspensión de dicotiledóneas requieren auxina pero no citocinina para crecer y pueden ser cultivados por largos periodos sin la primera cuando una elevada concentración de citocinina es adicionada al medio. A este nivel las citocininas parecen incrementar el nivel natural de auxinas contenido en los tejidos.

La formación de tallos adventicios implica un balance entre las concentraciones de auxinas y citocininas. La concentración de citocinina será mayor si se requiere obtener tallos de forma directa

como lo indican Bhattacharyya y Bhattacharyya (2001) en *Coleus forskohlii* Briq.

La proliferación de tallos axilares se da a niveles elevados de citocinina (George y Sherrington, 1984).

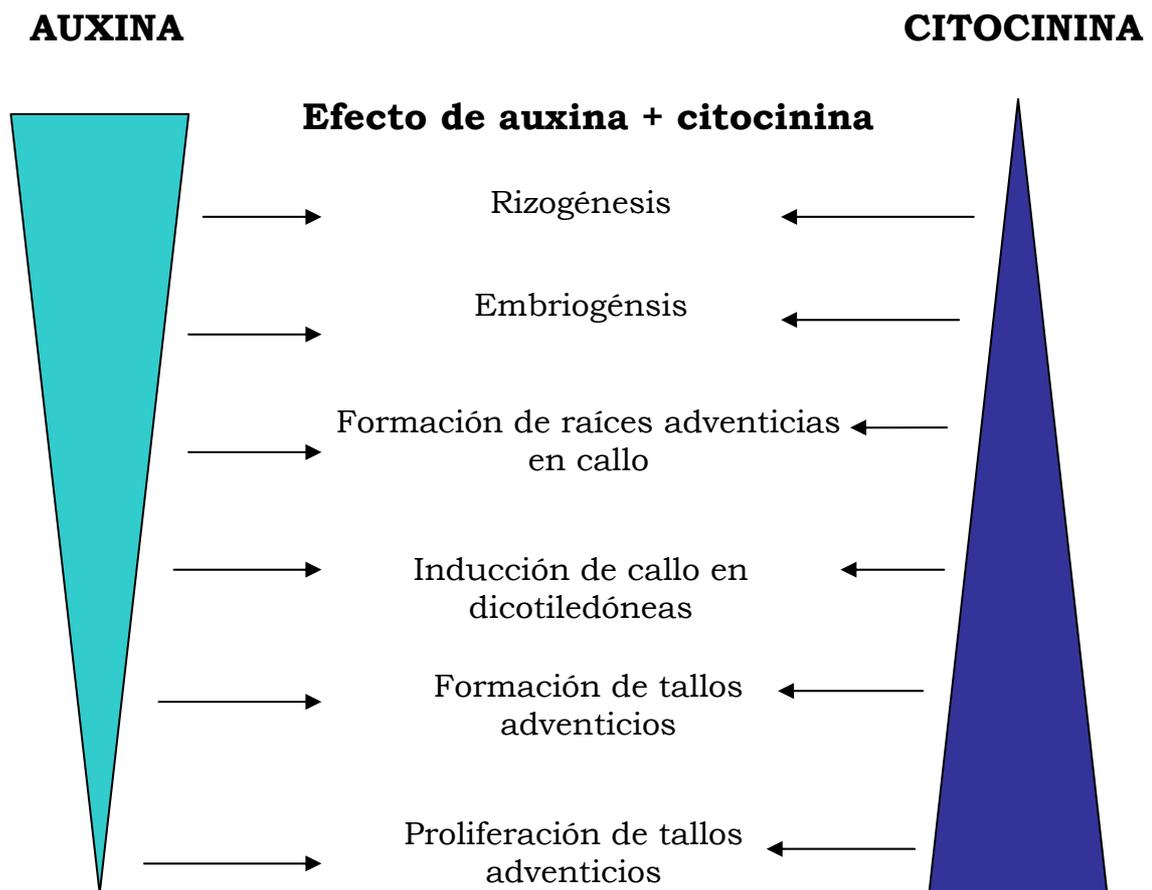


Figura 12. Cantidades relativas de una auxina y una citocinina que son requeridas para dar origen a algunos tipos de morfogénesis (George y Sherrington, 1984).

3.4.3 Contaminación

Los microorganismos provocan pérdidas cuantiosas de material vegetal en los procesos productivos o de investigación

Como contaminantes frecuentes en el cultivo *in vitro* se mencionan a los hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras. Muchos no son conocidos por causar daños a las plantas en campo y sin embargo se convierten en patógenos *in vitro*, Herman (1987) sugirió el término “vitropatógeno” para designarlos (Jiménez, 1998).

Su efecto negativo sobre las vitroplantas puede ser considerable si se tiene en cuenta que compiten con ellas por los nutrientes del medio y les provocan daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la expulsión al medio de cultivo de metabolitos tóxicos. De esta forma pueden reducir los coeficientes de multiplicación, inhibir el enraizamiento y ocasionar la muerte de la planta (Cassells, 1991).

Para prevenir o eliminar la contaminación en el cultivo *in vitro* se han ensayado y puesto en práctica diferentes alternativas que van desde el incremento de las medidas de asepsia, tratamientos de las plantas donantes, hasta el subcultivo de plántulas en medio de cultivo con productos antimicrobianos de origen sintético o natural.

Los contaminantes microbianos de la superficie de los explantes se eliminan comúnmente por inmersión de estos en soluciones desinfectantes tales como: etanol, hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, peróxido de hidrógeno, cloro comercial y bicloruro de mercurio, entre otros. Cuando es posible contar con planta donante de explantes en el invernadero se emplean algunos antibióticos, fungicidas e insecticidas previos a la desinfección del explante (Jiménez, 1998).

3.4.4 Oxidación

La coloración del medio por sustancias exudadas por los explantes es observada frecuentemente en muchas especies, especialmente las leñosas (Compton & Preece, 1986). El rango de colores varía de sombras en azul, púrpura, gris, café o negro. La coloración puede ubicarse al área inmediata que rodea la superficie del explante, o puede resultar en coloración del medio entero.

Según Compton *et al.*, (1991), la coloración es visible dentro de minutos, horas, o días después de que los explantes fueron sembrados. Un problema relacionado con esto se refiere a la oxidación café del

explante original o de tejidos que se desarrollan *in vitro*. También puede tratarse de una necrosis letal irreversible, indicar la muerte de los cultivos, un síntoma de estrés, o una señal de que pasos adicionales son necesarios si se quiere producir cultivos con un desarrollo saludable.

Una amplia variedad de técnicas han sido usadas cuando el problema se presenta. Estas incluyen:

- a) Tratamientos de almacenado.
- b) Selección adecuada de los explantes. Deben elegirse explantes provenientes de plantas sanas, preferiblemente jóvenes, con apariencia saludable y sin rastros de oxidación.
- c) Cuidados especiales durante la preparación del explante. Manipularlos de tal forma que el estrés sea el menor posible tomando en cuenta temperatura, luz y el contacto con las soluciones desinfectantes en caso de ser aplicadas.
- d) Uso de antioxidantes como ácido cítrico, ácido ascórbico o PVP y sus combinaciones en lavados o en el medio
- e) Lavado de explantes en agua estéril antes de pasarlo a otro medio
- f) Cambio del nivel de sacarosa en el medio
- g) Uso de medios líquidos en lugar de sólidos. El medio líquido propicia que los agentes oxidantes estén en constante movimiento evitando así que se concentren en una zona específica del explante atenuando además, el ataque de éstos.
- h) Cambio o variación en la concentración de los reguladores de crecimiento. Algunos fitorreguladores, como las auxinas pueden necrosar el tejido del explante.
- i) Uso de carbón activado en el medio.
- j) Incubación de los cultivos con baja intensidad luminosa o en oscuridad
- k) Evitar altas temperaturas en el cuarto de incubación.
- l) Desechar los explantes oxidados.

m) Realizar subcultivos en periodos cortos de tiempo o cuando la coloración sea notificada (Compton & Preece, 1991).

Los antioxidantes más empleados han sido (Jiménez, 1998):

- Ácido ascórbico
- Polivinilpirrolidona (PVP)
- L-cisteína
- Dithiotreitol
- Ácido cítrico
- Tiourea

Carbón activado

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Embriogénesis somática *in vitro*

4.1.1 Procedencia del material utilizado

Las plantas de *Cedrela odorata* L. utilizadas en este trabajo se obtuvieron de semillas colectadas en el Campo Experimental “El Palmar” ubicado en el Municipio de Tezonapa, Veracruz en el año 2005.

4.1.2 Explantes

Los primeros explantes utilizados para la inducción de embriogénesis somática fueron entrenudos obtenidos de plantas germinadas *in vitro*, y los segundos, secciones de cotiledón.

4.1.3 Obtención del material aséptico

Para obtener plantas donadoras de explantes, libres de patógenos, se aplicaron dos procedimientos de desinfección a las semillas, el primero fue siguiendo parte del método de Muñoz (2003), que consiste en:

- Corte del ala de las semillas para disminuir el área superficial del material a desinfectar.
- Lavado con agua jabonosa para eliminar los restos de polvo impregnados en la superficie, manteniéndose en agitación constante.
- Lavado con agua corriente.
- Cuprimicín 0.4% por 24 horas

Los tres últimos pasos de este proceso de desinfección se realizaron en campana de flujo laminar para optimizar las condiciones de asepsia:

- Alcohol al 70% durante 30 segundos
- Blanqueador comercial (Cloralex) al 10% v/v por 20 minutos
- Enjuagues con agua destilada y estéril 3 veces.

Debido a los resultados poco favorecedores se realizó el siguiente experimento combinando diferentes desinfectantes:

Cuadro 2. Tratamientos desinfectantes

Tratamientos	Cuprimicín (mg/100mL)	Alcohol (%)	Blanqueador comercial (Cloralex) (% v/v)	Tween 80 (%)	PPM (ml/100 ml)
1	450	70	1	0.0	0.0
2	500	70	1	0.0	0.0
3	500	70	15	0.01	0.0
4	500	70	20	0.01	0.0
5	500	70	20	0.01	1*
6	500	70	20	0.01	1*

* El PPM fue aplicado como enjuague por 2 horas para el tratamiento 5 y por 3 horas para el tratamiento 6.

4.1.4 Germinación

Una vez desinfectadas las semillas fueron sembradas en frascos Gerber con 30 ml de medio y vitaminas WPM (Lloyd y McCown, 1980) (Anexo 1) complementado con 20 g^l⁻¹ de sacarosa, 0.1 g^l⁻¹ de ácido ascórbico y 2 g^l⁻¹ de Phytigel.

Las semillas permanecieron en cuarto de incubación con fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de 25 ± 1 °C.

4.1.5 Antioxidantes

Debido al antecedente de oxidación en los primeros tratamientos de inducción de embriogénesis somática, se hicieron varios ensayos con antioxidantes en los medios WPM (Cuadro 3) y B5 (Cuadros 4 y 5) usando como explantes entrenudos.

Se sembraron 90 repeticiones para cada tratamiento antioxidante en los dos medios de cultivo ya mencionados.

Cuadro 3. Tratamientos antioxidantes en medio WPM

Número	Tratamiento	Concentración (g·l⁻¹)
1	Ácido cítrico	0.1
2	Ácido ascórbico	0.1
3	PVP	0.1
4	Ác. Ascórbico + PVP	0.1

Cuadro 4. Tratamientos antioxidantes en medio B5

Número	Tratamiento	Concentración (g·l⁻¹)
1	Ácido cítrico	0.1
2	Ácido ascórbico	0.1
3	PVP	0.1
4	Ác. Ascórbico + PVP	0.1

Posteriormente se realizaron nuevos tratamientos antioxidantes (Cuadro 5) en medio B5 debido a que en este medio se tuvo una buena respuesta para la etapa de formación de callo.

Cuadro 5. Tratamientos antioxidantes 2 en medio B5

Número	Tratamiento	Concentración (g·l⁻¹)
1	Ácido ascórbico	1
2	Ácido ascórbico	1.5
3	PVP	1
4	PVP	1.5
5	Ác. ascórbico+PVP	1
6	Ác. ascórbico+PVP	1.5
7	Carbón activado+PVP	1

4.1.6 Formación de callo

De las plantas con 2 meses de edad obtenidas por germinación *in vitro*, se tomaron secciones de entrenudo de 1cm aproximadamente, los cuales se cultivaron en los medios WPM (Lloyd y McCown, 1980) y B5 (Gamborg *et al.*, 1968) (Anexo 1) complementados con L-aminoácidos, sacarosa y bactoagar como se indica en el Cuadro 6 y sin fitorreguladores.

Cuadro 6. Medios WPM y B5 para inducción de callo

Compuestos	WPM 2.3 (g·l⁻¹)	B5 3.1 (g·l⁻¹)
L-Glutamina	0.4	0.4
Hidrolizado de caseína	0.1	0.1
L-arginina	0.1	0.1
Sacarosa	60	60
Bactoagar	8	8

Se sembraron 30 repeticiones por medio.

Se realizó además una siembra en ambos medios con el siguiente tratamiento hormonal:

Cuadro 7. Tratamiento hormonal 0

Tratamiento	Concentración (μM)
2,4-D	0.090

Se sembraron 90 repeticiones por medio.

Se realizaron siembras de secciones de cotiledón de cedro rojo en medio B5 complementado con la misma cantidad de nutrientes y con las concentraciones hormonales que se muestran en los Cuadros 8 y 9:

Cuadro 8. Tratamientos hormonales 1-12

Tratamientos	Kinetina μM	2,4-D μM
1	0	0
2	0	18
3	0	36
4	0	54
5	9	0
6	9	18
7	9	36
8	9	54
9	22.5	0
10	22.5	18
11	22.5	36
12	22.5	54

Cuadro 9. Tratamiento hormonal 13

Tratamiento	μM
2,4-D/ Kinetina	9/2.25

Se cultivaron 30 repeticiones por cada tratamiento hormonal.

Los callos obtenidos en los tratamientos mencionados, fueron subcultivados a medios líquidos que conservaban la composición original del medio sólido. Los medios estuvieron en agitación a 110 rpm, en oscuridad y temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de aproximadamente 2 meses, los fitorreguladores fueron eliminados del medio. A estos callos, se les aplicó la prueba Doble tinción.

Los callos restantes se incubaron por 15 días más y posteriormente se les aplicó la doble tinción.

Prueba: Doble tinción

Según la técnica reportada por Gupta y Durzan en 1987 para identificar las células formadoras de la cabeza embrionaria y las células del suspensor.

Se preparó acetocarmín al 2% y Azul de Evans al 0.5% (disuelto en agua).

Se tomó una muestra de tejido calloso de aproximadamente 3 mm³ (de preferencia friable) y se colocó en un tubo eppendorf con 0.5 ml de medio líquido en que se encontraba; a esto se adicionaron 0.5 ml de acetocarmín y se tapó para introducirlo en agua caliente durante 30 segundos. Transcurrido el tiempo, se le retiró el colorante.

Posteriormente se adicionaron 0.5 ml de Azul de Evans.

Se lavó la muestra con medio para remover el exceso de coloración y se filtró.

Se preparó una laminilla y se observó al microscopio.

4. 2 Cultivo de ápices para la obtención de planta

Se emplearon zonas apicales de plántulas germinadas *in vitro* con 2 meses de edad, las cuales fueron sembradas en medio WPM (**Anexo 1**) complementado con 20 g l⁻¹ de sacarosa y 8 g l⁻¹ de agar.

Con la finalidad de inducir brotación múltiple, se probaron 2 tratamientos hormonales:

Cuadro 10. Tratamientos hormonales para organogénesis

Tratamientos	Kinetina μM
1	0.93
2	1.125

Se sembró 1 explante por frasco en un total de 30 frascos por cada tratamiento.

4.2.1 Aclimatización de plantas obtenidas *in vitro*

Las plantas obtenidas a partir del cultivo de ápices se sembraron después de 7 meses en sustrato compuesto por 5 partes peat-moss, 3 partes de vermiculita y 2 partes de agrolita, se colocaron los ingredientes formando una pila, sobre un piso limpio o plástico. Todo el conjunto se mezcló uniformemente con una pala, obteniendo un producto que cumplía con las características deseables para la propagación.

El sustrato se esterilizó en un autoclave a 121°C por media hora.

Las plantas se desinfectaron en una solución al 0.2% de captan 50 y mancosol 80 por 20 minutos de inmersión

Una vez desinfectadas las plantas, se depositaron en tubetes (previamente lavados y desinfectados) de 4 cm de diámetro por 20.5 cm de largo en forma cónica en charolas de 49 y 98 unidades.

La temperatura en invernadero fue de 18 a 27 °C. Se regaron 3 veces al día para mantener saturación de humedad y el sombreado fue a partir de material plástico con una intensidad del 50%.

4.3 Análisis estadístico

El diseño experimental para cada experimento fue completamente al azar. Todas las variables fueron de tipo binomial.

En virtud de que para las variables material libre de contaminantes y material libre de oxidación se compararon más de dos tratamientos, para definir el más adecuado, se obtuvieron las estimaciones puntuales y por intervalo, como se indica a continuación:

Desviación estándar:

$$S_{\bar{p}} = \sqrt{\frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{(1-\bar{p})} \left(1 - \frac{n}{N}\right)}$$

Donde:

$S_{\bar{p}}$ = desviación estándar

\bar{p} = estimación puntual

n = muestra

N = lote de explantes

Intervalo de confianza:

$$\left[\hat{\theta} - \frac{\sigma(\hat{\theta})}{\sqrt{\alpha}}, \hat{\theta} + \frac{\sigma(\hat{\theta})}{\sqrt{\alpha}} \right]$$

Donde:

$\hat{\theta}$ = estimación puntual

α = 0.05 nivel de significancia

Los datos obtenidos para germinación y formación de brotes y raíces en cultivo de ápices se analizaron mediante proporciones binomiales ya que sólo se compararon 2 tratamientos. La hipótesis planteada fue:

$$H_0: p_1 - p_2 = 0 \text{ en oposición a } H_a: p_1 - p_2 \neq 0$$

Para lo cual se aplicó el siguiente estadístico

$$Z_o = \frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n} + \frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{m}}}$$

Donde:

Z_o = estadístico

\hat{p}_1 : proporción estimada para el tratamiento 1

\hat{p}_2 : proporción estimada para el tratamiento 2

$$\hat{p} = \frac{X + Y}{n + m}$$

X = muestra de la población 1

Y = muestra de la población 2

m = número de observaciones para el tratamiento 1

n = número de observaciones para el tratamiento 2

Con $\alpha = 0.05$ y $Z_{0.025} = 1.96$

Con la regla de decisión $Z_o \geq 1.96$ se rechaza H_o .

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Embriogénesis somática *in vitro*

5.1.1 Obtención de material vegetal aséptico

En las semillas que fueron desinfectadas utilizando el método de desinfección reportado por Muñoz (2003) se observó el 100% de material contaminado, por lo cual se llevo a cabo un experimento donde se probaron 6 nuevos tratamientos desinfectantes con 60 repeticiones cada uno.

Las estimaciones puntuales de la proporción de semillas libres de contaminantes, al considerar los 6 tratamientos estudiados presentan alta variabilidad, oscilan desde 0.5 hasta 1. Las diferencias significativas entre los tratamientos se confirman en las estimaciones por intervalo (Cuadro 11).

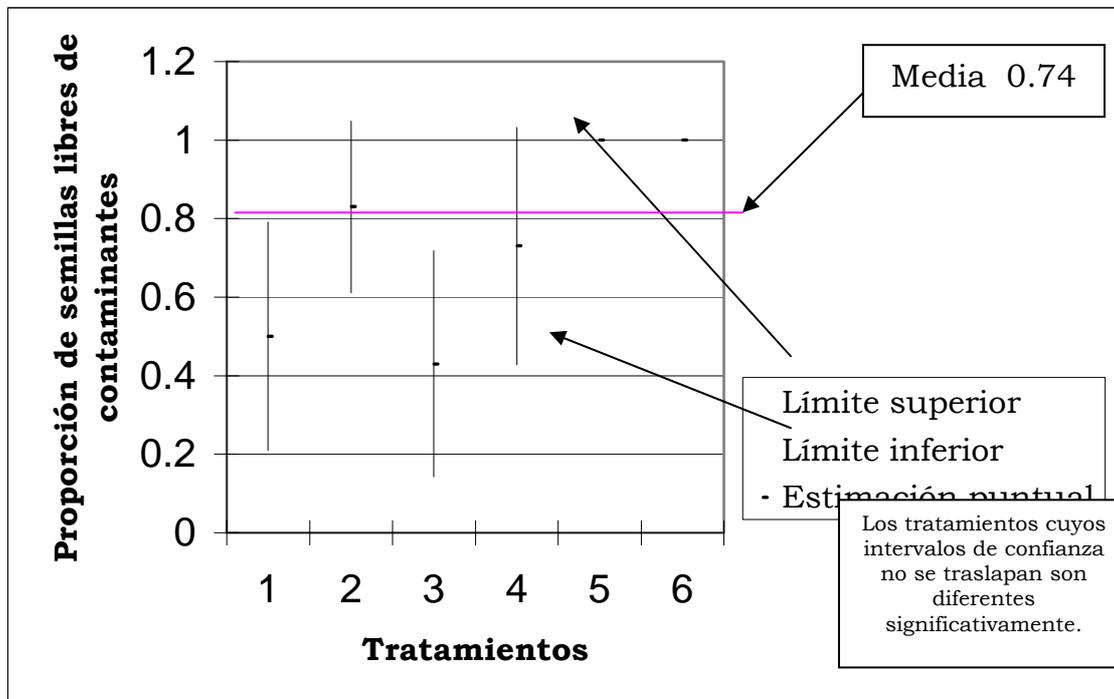
Cuadro 11. Estimaciones puntuales e intervalos de confianza al 95% para la proporción de semilla libre de contaminantes.

Número de tratamiento	Tratamiento	Estimación puntual	Límite inferior	Límite superior
1	450 mg ^l ⁻¹ /100 ml de Cuprimicín, alcohol al 70 % y blanqueador comercial al 1 %.	0.5	0.20	0.79
2	500 mg ^l ⁻¹ /100 ml de Cuprimicín, alcohol al 70 % y blanqueador comercial 1 %	0.83	0.61	1.04
3	500 mg ^l ⁻¹ /100 ml de Cuprimicín, alcohol al 70 %, blanqueador comercial al 15 % y tween 80 al 0.01 %.	0.43	0.14	0.71
4	500 mg ^l ⁻¹ /100 ml de Cuprimicín, alcohol al 70 %, blanqueador comercial al 20 % y tween 0.1 %	0.73	0.42	1.03
5*	500mg ^l ⁻¹ /100 ml de cuprimicín, alcohol al 70 %, blanqueador comercial al 20 %, tween 0.1% y 1ml/100ml de PPM	1	1	1
6*	500mg ^l ⁻¹ /100 ml de cuprimicín, alcohol al 70 %, blanqueador comercial al 20 %, tween 0.1% y 1ml/100ml de PPM	1	1	1

* enjuague en PPM por 2 y 3 horas, respectivamente

Los tratamientos 1, 2, 3 y 4 forman un primer grupo, presentaron una baja e intermedia proporción de material libre de contaminantes y no presentaron diferencias significativas entre ellos.

Los tratamientos 5 y 6 mostraron excelentes resultados (100% de semillas libres de contaminantes en ambos casos) en la desinfección y no presentaron diferencias significativas entre ellos a pesar de la variación en los tiempos de enjuague en PPM. Estos tratamientos forman un segundo grupo con los tratamientos 2 y 4, los cuales no incluyeron PPM. Evidentemente, los tratamientos 1 y 3 respecto a 5 y 6 son diferentes significativamente (Gráfica 1).



Gráfica 1. Proporción de Semillas libres de contaminantes.

El tratamiento seleccionado para la desinfección de explantes durante este trabajo fue el 5 por su elevado porcentaje de material libre de contaminantes y debido a que el tiempo de enjuague en PPM es menor que el tratamiento 6.

Ruíz (2000) trabajó con hipoclorito de sodio al 10% y 20 gotas/250 ml del bactericida Microdín, ya que se presentó un bajo índice de contaminación en los explantes de cedro rojo y omitió el uso de Tween debido a los daños causados al tejido del explante.

Pérez *et al.* (2002) observaron que en la semilla con 4-24 meses de haber sido colectada existen diferencias respecto al porcentaje de contaminación (25% en semilla de recolección reciente y 10% en semilla con 4 o más meses de almacenada).

5.1.2 Germinación

La germinación *in vitro* de semillas de cedro rojo se dio entre los 9 y 12 días después de su siembra (Figura 13).



Figura 13. Plántula de *Cedrela odorata* L. en medio WPM, bajo condiciones de penumbra a los 22 días de siembra.

Se tuvo una germinación del 45.74% del material. El porcentaje de germinación *in vitro* obtenido en este trabajo se redujo casi a la mitad de lo obtenido en el Vivero Forestal Militar “Othón P. Blanco” ubicado en Chetumal, Quintana Roo y Vivero “General Ignacio de la Llave” localizado en Tierra Blanca, Veracruz, donde los porcentajes para cedro rojo fueron de 90 y 80%, respectivamente (CONAFOR, 2005).

Los resultados obtenidos en laboratorio están relacionados con los tiempos de almacenamiento de las semillas y el estrés a que son sometidas durante el tratamiento desinfectante y posiblemente a la temperatura, ya que según los reportes de Corbineau *et al.* (1995), la

germinación de éstas se lleva a cabo sin ninguna dificultad entre los 15 y 35°C tanto a la luz como a la oscuridad, siendo más rápida entre los 30 y 35°C.

No se presentaron problemas relacionados con las condiciones bajo las que se trabajó en el laboratorio, en el cual se manejó una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

5.1.3 Antioxidantes

Mediante la prueba de proporciones binomiales se obtuvo un valor de $Z_0 = 0.526$ que al ser menor de 1.96 no se rechazó H_0 , lo cual indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos libres de fitorreguladores.

Los resultados obtenidos para entrenudos libres de oxidación en los medios B5 y WPM sin antioxidantes, respectivamente, fueron favorables como se presenta en el Cuadro 12:

Cuadro 12. Proporción de entrenudos no oxidados para los tratamientos libres de antioxidantes.

Número de tratamiento	Tratamiento	Proporción de entrenudos no oxidados
1	WPM	70
2	B5	76.6

Se ha encontrado que cuando los tejidos de una planta están expuestos a situaciones de estrés tales como el daño mecánico, se estimula el metabolismo de los compuestos fenólicos (Debergh & Read, 1991). Tales compuestos producen efectos negativos en el crecimiento de los explantes ya que se oxidan con facilidad, y se convierten en fuertes agentes oxidantes (Jiménez, 1998) como se observa en las Figura 14.

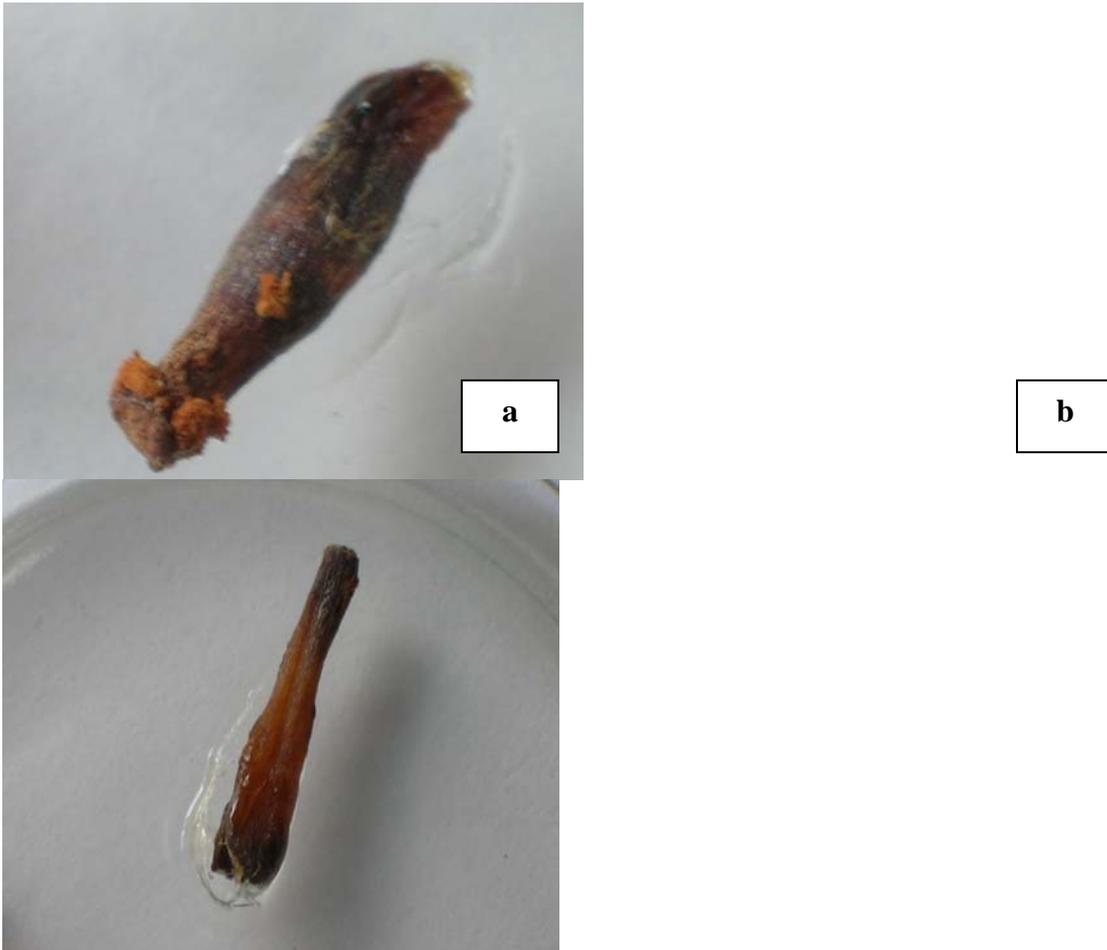


Figura 14. a) Entrenudo oxidado en medio B5 y b) Entrenudo oxidado en medio WPM.

Tratamientos antioxidantes en Medio WPM

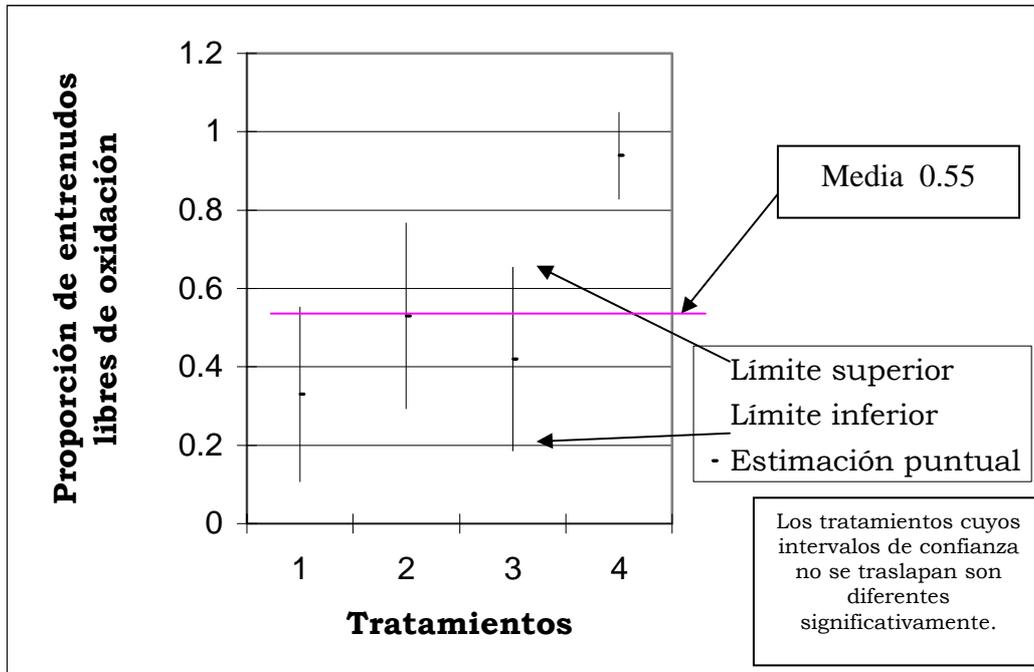
Las estimaciones puntuales de la proporción de entrenudos libres de oxidación, al considerar los cuatro tratamientos estudiados, presentan una alta variabilidad, oscilan desde 0.33 hasta 0.94. Las diferencias significativas entre los tratamientos se observan en las estimaciones por intervalo (Cuadro 13).

Cuadro 13. Estimaciones puntuales e intervalos de confianza al 95 % para la proporción de entrenudos libres de oxidación en Medio WPM.

Número de tratamiento	Tratamiento	Estimación puntual	Límite inferior	Límite superior
1	0.01 g l ⁻¹ Ácido cítrico	0.33	0.10	0.55
2	0.1 g l ⁻¹ Ácido ascórbico	0.53	0.29	0.76
3	0.1 g l ⁻¹ PVP	0.42	0.18	0.65

4	0.1 g ^l ⁻¹ Ác. ascórbico + 0.1 g ^l ⁻¹ PVP	0.94	0.82	1.05
----------	---	------	------	------

Un primer grupo de esta prueba está formado por los tratamientos 1, 2 y 3 (Gráfica 2).



Gráfica 2. Proporción de entrenudos libres de oxidación para el medio WPM.

El tratamiento 4 de manera individual forma un segundo grupo, y mostró un excelente porcentaje de entrenudos libres de oxidación por lo cual fue seleccionado para continuar con las pruebas para reducir o eliminar la oxidación.

McComb y Newton (1981) encontraron que al adicionar 0.2 mg^l⁻¹ de ácido ascórbico y 0.02 mg^l⁻¹ de PVP no hubo una reducción en la cantidad de exudados de color azul oscuro en el medio pero que algunos clones de *Anigozanthos manglesii* y *A. pulcherrimus* producían menos coloración.

Tratamientos antioxidantes en Medio B5

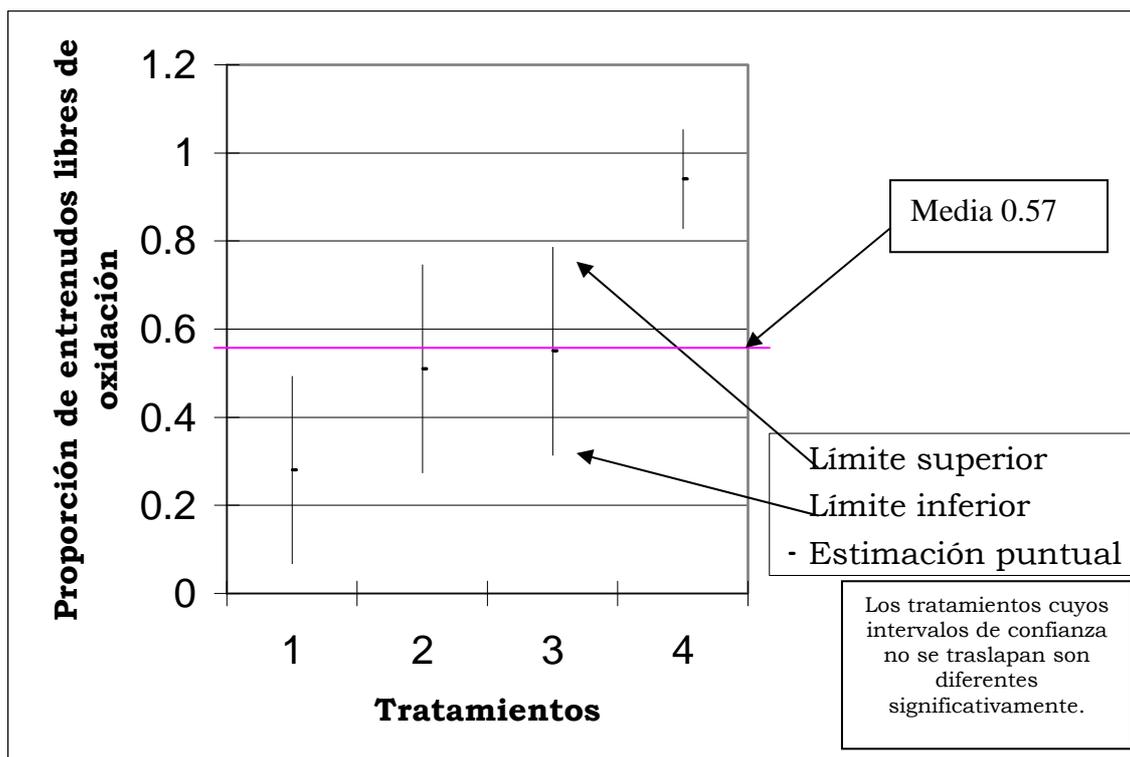
Las estimaciones puntuales de la proporción de entrenudos libres de oxidación, al considerar los cuatro tratamientos estudiados, son muy variables, desde 0.28 a 0.94. Las diferencias significativas entre los tratamientos se observan en el no traslape de las estimaciones por intervalo (Cuadro 14).

Cuadro 14. Estimaciones puntuales y por intervalo de confianza al 95% para las proporciones de entrenudos libres de oxidación en medio B5.

No. de tratamiento	Tratamiento	Estimación puntual	Límite inferior	Límite superior
1	0.01 g·l ⁻¹ Ácido cítrico	0.28	0.06	0.49
2	0.1 g·l ⁻¹ Ácido ascórbico	0.51	0.27	0.74
3	0.1 g·l ⁻¹ PVP	0.55	0.31	0.78
4	0.1 g·l ⁻¹ Ác. ascórbico + 0.1 g·l ⁻¹ PVP	0.94	0.82	1.05

Los tratamientos 1, 2 y 3 forman un primer grupo y no son significativamente diferentes entre ellos.

Por otro lado, existen diferencias significativas entre este grupo y el conformado por el tratamiento 4, el cual tuvo una mayor proporción de entrenudos libres de oxidación (Gráfica 3).



Gráfica 3. Proporción de entrenudos libres de oxidación para el medio B5.

Ruiz (2000), señala el uso de pirogalol como buen reductor al emplearse en concentraciones de 25 mg l^{-1} y combinarse con 100 mg l^{-1} de ácido ascórbico en el medio.

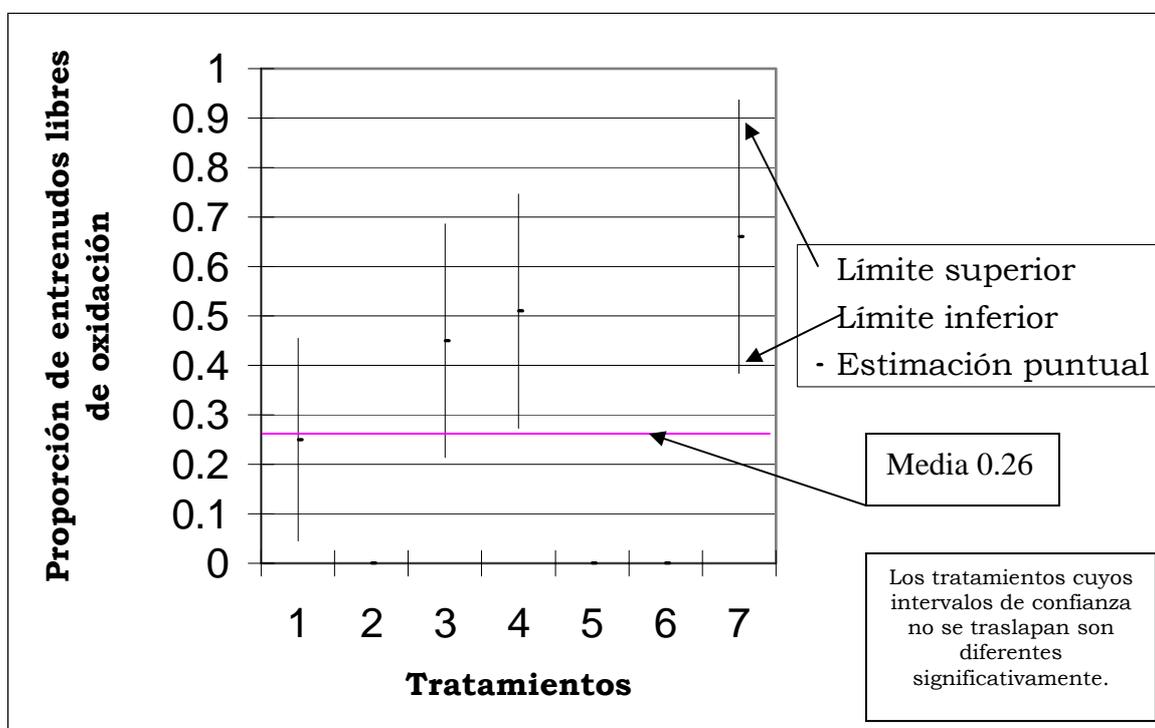
Lo anterior sugiere que el ácido ascórbico adicionado al medio nutritivo o en forma de enjuague debe ser empleado combinándolo con otros antioxidantes.

Similar a lo obtenido en los tratamientos para el medio WPM con entrenudos como explante, se puede observar que el mejor tratamiento fue el 4, por lo cual fue seleccionado para continuar con las pruebas para la reducción o eliminación de oxidación en los explantes.

A los 2 meses de incubación de los entrenudos, la apariencia de los callos, comenzó a presentar cambios y mostrar signos de oxidación.

Tratamientos antioxidantes 2 en medio B5

Las estimaciones puntuales de la proporción de semillas libres de oxidantes para los 7 tratamientos estudiados, son altamente variables, oscilan desde 0 hasta 0.66. Las diferencias significativas entre los tratamientos se confirman en las estimaciones por intervalo (Cuadro 15). Los tratamientos 1, 3, 4 y 7 forman un primer grupo y no son diferentes significativamente entre sí, mientras que los tratamientos 2, 5 y 6 forman un segundo grupo y tampoco presentan diferencias significativas entre ellos. Entre ambos grupos existen diferencias significativas.



Gráfica 4. Proporción de entrenudos libres de oxidación para los antioxidantes 2 en medio B5.

Cuadro 15. Estimaciones puntuales y por intervalos de confianza al 95 % para la proporción de entrenudo libre de oxidación para medio B5.

No. De tratamiento	Tratamiento	Estimación puntual	Límite inferior	Límite superior
1	1 g ⁻¹ Ácido ascórbico	0.25	0.04	0.45

2	1.5 g ^l ⁻¹ Ácido ascórbico	0	0	0
3	1 g ^l ⁻¹ PVP	0.45	0.21	0.68
4	1.5 g ^l ⁻¹ PVP	0.51	0.27	0.74
5	1 g ^l ⁻¹ Ácido ascórbico + g ^l ⁻¹ PVP	0	0	0
6	1.5 g ^l ⁻¹ Ácido ascórbico + g ^l ⁻¹ PVP	0	0	0
7	1 g ^l ⁻¹ Carbón activado + 1 g ^l ⁻¹ PVP	0.66	0.38	0.93

El tratamiento 7 tuvo excelentes resultados en la reducción de los problemas de oxidación. Sin duda, el porcentaje de formación de callo en este tratamiento no fue el óptimo.

Por otro lado, los tratamientos 3 y 4, tuvieron una respuesta regular en cuanto a la reducción de oxidación pero presentaron mejores porcentajes para el caso de formación de callo. El tratamiento 3 redujo la oxidación con una menor cantidad de PVP y fue elegido para continuar con los cultivos.

El uso de medio B5 y 1 g^l⁻¹ de PVP fue informado por Stevenson y Harris (1980) quienes encontraron que los exudados púrpuras producidos por los tallos de *Fuchsia hybrida*, disminuyeron considerablemente al emplearlos. Además, se encontró que al utilizar PVP no se inhibía el crecimiento de los explantes, todos estos beneficios fueron observados para el caso de cedro rojo.

5.1.4 Formación de callo

Los mejores resultados en cuanto a la formación y apariencia del callo se observaron al utilizar 9 µM de 2,4-D y 2.25 µM de kinetina en medio B5 (Figura 15).

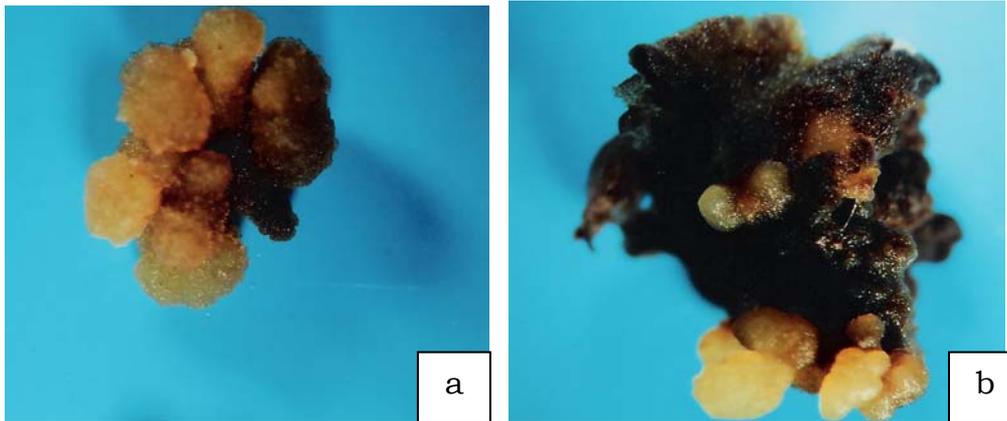


Figura 15. Callos obtenidos a partir de sección de cotiledón de *Cedrela odorata* L. en medio líquido B5 con 9 μM de 2,4-D y 2.25 μM de kinetina: a) sección de callo y b) callo con protuberancias.

Según Muñoz (2003) las masas callosas embriogénicas de cedro rojo tienen una coloración amarilla o blanca usando secciones de cotiledón o entrenudo como explante.

La formación de callo embriogénico en *Ceratozamia hildae* obtenida a partir de hoja empleando medio B5 con 60 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de sacarosa, 0.4 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de glutamina, 0.1 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de arginina, fue observada por Litz *et al.* (1995), lo cual corresponde con lo observado para cedro rojo.

De acuerdo con lo señalado por Dhanalakshmi & Lakshmanan (1991) para *Clitoria ternatea*; Echenique *et al.* (1996) en *Eragrostis curvula*; Cailloux (1996) para *Hevea brasiliensis*, y lo obtenido en este trabajo, las condiciones de oscuridad durante la incubación de los cultivos favorecieron la obtención de callos con menor porcentaje de oxidación.

Das y Raychaudhuri (2001), reportan cultivos de callo embriogénico de *Plantado ovata* Forsk. Al emplear 4.5 μM de 2,4-D y 2.3 μM de kinetina. El porcentaje de formación de callo embriogénico fue bajo (21.11%). Según las pruebas realizadas por Konan *et al.* (1993) en *Manihot esculenta* Crantz, se puede obtener callo embriogénico a partir de cotiledones desde un 44.4% hasta 79.68% al emplear 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (18 μM) de 2,4-D.

Doble tinción

Mediante la doble tinción fue posible identificar dos tipos de células (Figura 17). Las primeras, con núcleos intensamente teñidos de rojo y con citoplasmas naranjas son células en activa división y formarán parte de la cabeza embrionaria. Las segundas, vacuoladas y con núcleos azules son las células del suspensor.

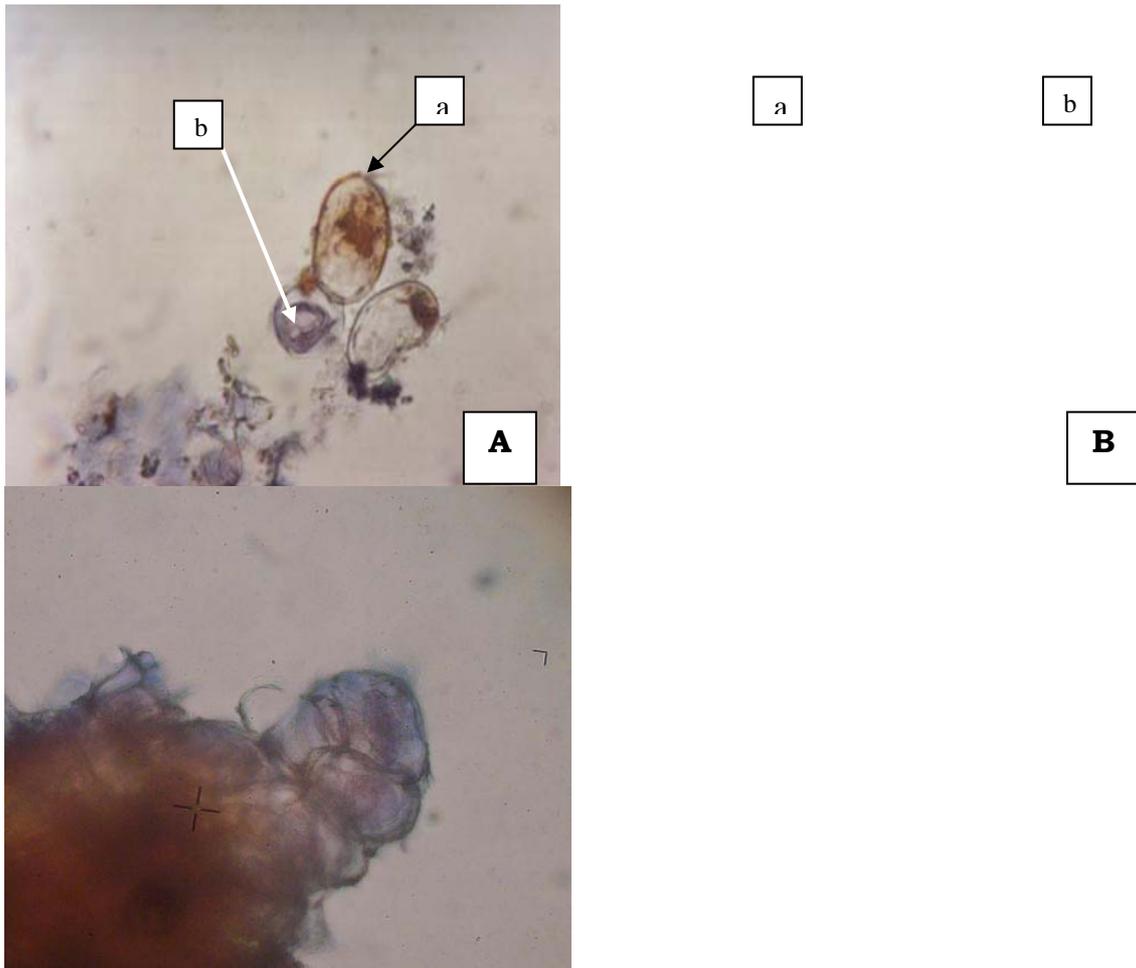


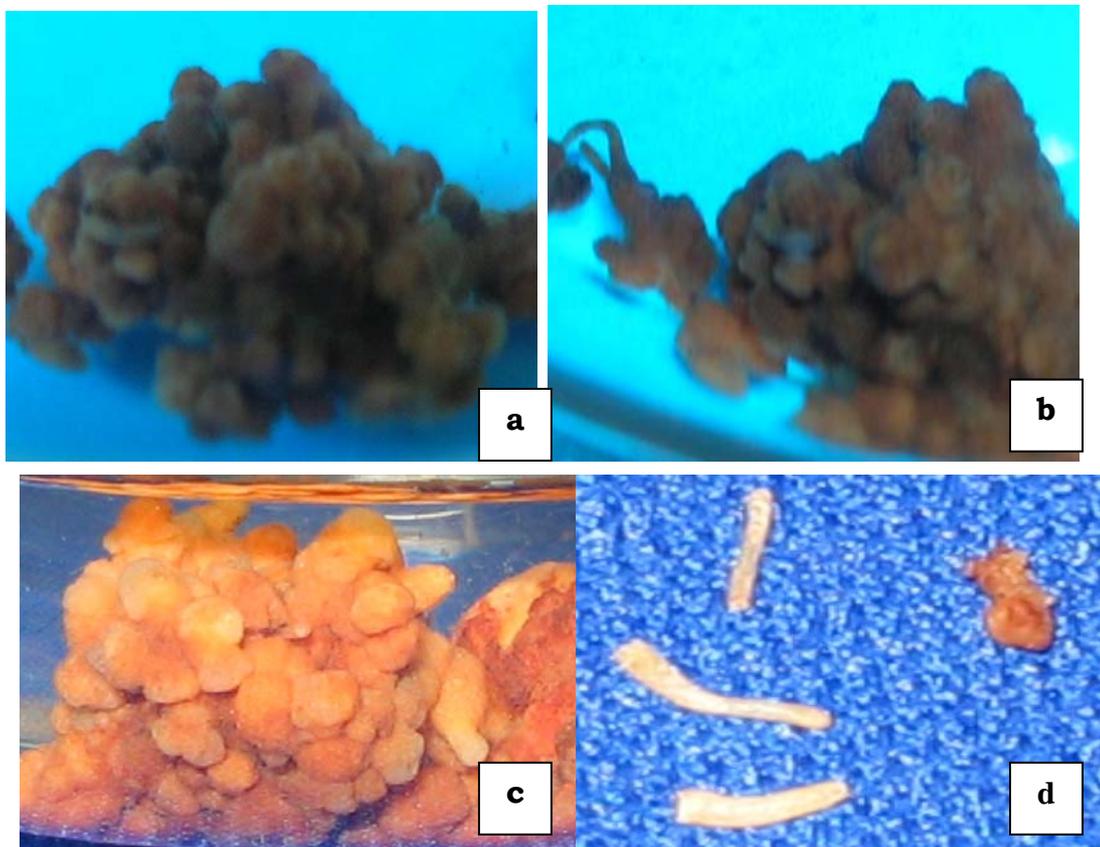
Figura 16. A) Callo embriogénico: a) célula en activa división y b) célula del suspensor. B) Embrión globular: a) células de la cabeza embrionaria y b) células del suspensor.

Gupta y Durzan (1987) encontraron dos tipos celulares mediante la doble tinción para *Pinus taeda* L. que corresponden con lo observado en cedro rojo.

Marín (1998), observó los complejos celulares teñidos diferencialmente para *Mammillaria san-angelensis* siguiendo la técnica antes mencionada.

Los mejores resultados, se observaron al utilizar la combinación $9 \mu\text{M}$ de 2,4-D y $2.25 \mu\text{M}$ de kinetina donde una cantidad considerable de embriones en etapa globular fueron observados.

El paso de un medio de cultivo con auxinas a otro que carece de ella puede ser crucial, ya que se ha demostrado que la presencia de auxina exógena permite la inducción y el desarrollo hasta estados globulares, sin embargo si éstas continúan presentes pueden disminuir e incluso inhibir el desarrollo de estados más avanzados (Marín, 1998) (Figura 16).



Figuras 17. Embriones obtenidos a partir de secciones de cotiledón de *Cedrela odorata* L. en medio líquido B5 a las 2 semanas de retirados los fitorreguladores 2,4-D y kinetina: a), b) y c) embriones globulares, y d) embriones desprendidos del explante.

Sin embargo no se puede asegurar que en este trabajo las auxinas hayan influido para que esto ocurriera ya que al realizar los subcultivos en medio libre de 2,4-D no se dio la transición al siguiente estadio.

Chakravarty *et al.* (2001), informa la presencia de células proembriogénicas en cultivos en suspensión de *Schizachyrium scoparium* (Michx.) Nash Var. *Stoloniferum* (Nash) J. Wipff, al emplear una menor concentración de de 2,4-D (6.75 μM) con 0.90 μM de BA y GA₃, y 1.25 μM de zeatina.

Liu *et al.* (2001) obtuvo, en cultivos en suspensión, callo embriogénico con embriones somáticos al usar 9.05 μM de 2,4-D para *Ipomoea batatas* L.

5.2 Cultivo de ápices para la obtención de planta

La zona apical de la plántula de cedro rojo dio resultados favorables en medio WPM al mostrar la formación de brotes y raíces (Figura 18).

La prueba de proporciones binomiales para la formación de brotes arrojó un valor de $Z_0 = 0.358$ que al ser menor de 1.96 no se rechazó H_0 , lo cual indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 16). Por lo anterior, se elige el tratamiento 1 debido a que implica menor cantidad de kinetina.

Cuadro 16. Proporción de formación de brotes mediante tratamientos con kinetina.

No. de tratamiento	Tratamiento	Formación de brotes (%)
1	0.9 μM	86.6
2	1.125 μM	83.3

El porcentaje de brotación usando 0.9 y 1.125 μM (tratamientos 1 y 2, Cuadro 16) de kinetina fue mucho mayor que lo obtenido por Pérez *et al* (2002), para cedro rojo (33.2%), al utilizar 2.2 μM del mismo fitorregulador.

Muñoz (2003) informa que el uso de kinetina 2 ppm en el cultivo de ápices necrosó la base del esqueje y propició la deformidad de las hojas.

La prueba de proporciones binomiales para la formación de raíces arrojó un valor de $Z_0 = 0.345$ que al ser menor de 1.96 no se rechazó

Ho, lo cual indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 17). Por lo anterior, se elige el tratamiento 1 debido a que implica menor cantidad de kinetina.

Cuadro 17. Proporción de formación de raíces mediante tratamientos con kinetina.

No. de tratamiento	Tratamiento	Formación de raíces (%)
1	0.9 μ M	30
2	1.125 μ M	26.6

En algunos casos se ha observado que las citocininas a muy bajas concentraciones promueven la formación o el crecimiento de raíz en la ausencia de auxinas (Nemeth, 1979).

La formación de brotes se obtuvo en un mayor porcentaje respecto a la formación de raíz en ambos tratamientos.

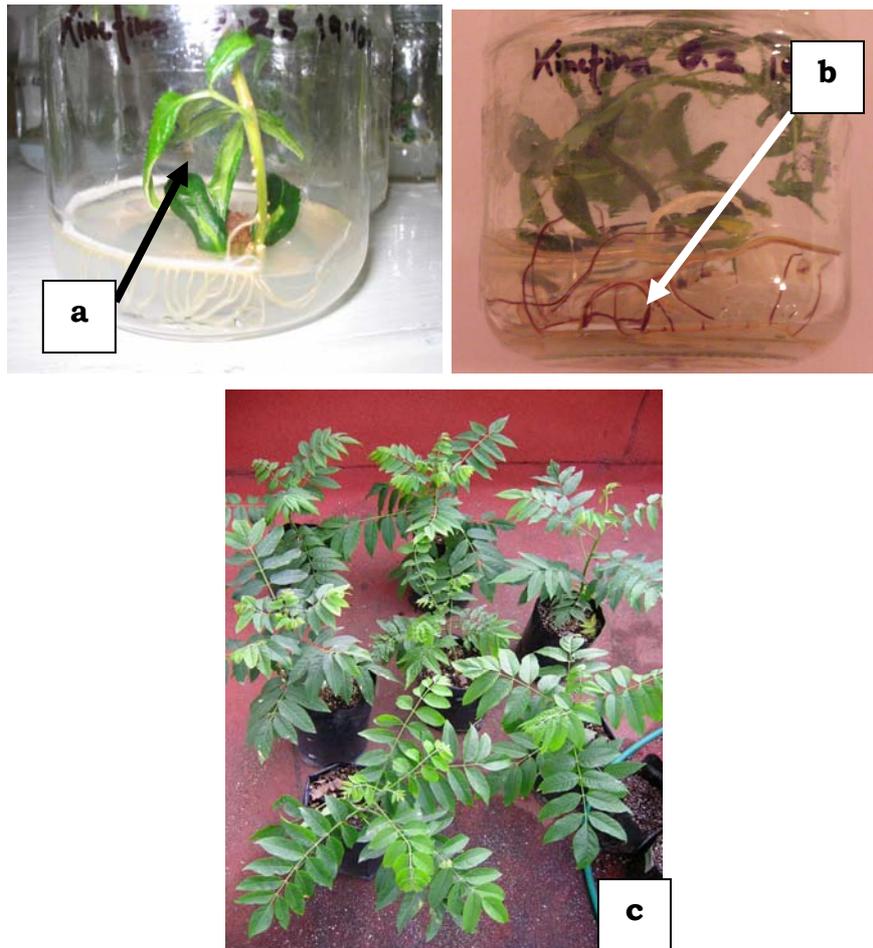


Figura 18. Plántula de cedro a los 6 meses en medio WPM con 0.9 μM de kinetina: a) rebrotes, b) raíces y c) plantas de cedro con 1 año de edad obtenidas *in vitro* y aclimatizadas.

Bhattacharyya y Bhattacharyya (2001) al utilizar 0.46 μM de kinetina y 0.57 μM de AIA en el cultivo de ápices obtuvieron un el 100 % de plantas propagadas y enraizadas posteriormente establecidas en suelo con un elevado porcentaje de sobrevivencia.

6. CONCLUSIONES

- El mejor método de desinfección para semillas de cedro rojo, se logra de la siguiente manera: corte del ala de las semillas para disminuir la superficie a desinfectar, lavado en agua jabonosa y en agitación por diez minutos, lavado con agua corriente durante 5 minutos, enjuague en cuprimicín a 0.05% durante 24 horas; en campana de flujo laminar: alcohol al 70% durante 1 minuto, solución en blanqueador comercial (Cloralex) + Tween 80 por 20 minutos, enjuague en 1 ml/100 ml de PPM durante 2 horas, 3 enjuagues de agua destilada y estéril.
- El mejor antioxidante fue PVP al 0.1% y 0.15%.
- El mejor explante para la obtención de callo embriogénico son las secciones de cotiledón de cedro.
- La producción de callo embriogénico se apreció con la combinación hormonal: 9 μ M de 2,4-D y 2.25 μ M de kinetina.
- Se logró la formación de embriones somáticos similares a los embriones cigóticos.
- Las zonas apicales de plántulas germinadas *in vitro* dieron buenos resultados para los tratamientos de organogénesis.
- El cultivo de ápices a partir de plántulas germinadas *in vitro* tuvo resultados favorables cuando fueron sembrados en los tratamientos 0.9 y 1.125 μ M de kinetina.

7. RECOMENDACIONES

- El porcentaje de callos embriogénicos, en este trabajo, fue bajo por lo cual se recomienda hacer pruebas con otras concentraciones y combinaciones hormonales.

8. ANEXO

Formulación de los medios WPM (Lloyd & Mc Cown, 1980) y B5 (Gamborg et al., 1968).

Componentes	WPM mg·l ⁻¹	B5 mg·l ⁻¹
<i>Macronutrientes</i>		
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134
(NH ₄)NO ₃	400	-
KNO ₃	-	2500
Ca(NO ₃) ₂	556	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	96	150
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	150
<i>Micronutrientes</i>		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	-
Na ₂ EDTA	37.3	-
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	2.0
H ₃ BO ₃	6.2	3.0
KI	0.83	0.75
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025
EDTA sal férrica de sodio	-	40
<i>Vitaminas</i>		
Tiamina HCl	1.0	10
Ácido nicotínico	0.5	0.5
Piridoxina HCl	0.5	0.5
Glicina	2.0	2.0
Myo-inositol	100	100
<i>Sacarosa</i>		
	20000	20000

9. ABREVIATURAS

BAP	6-bencilaminopurina
B5	Medio Gamborg <i>et al.</i> , 1960.
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
DN	Diámetro normal
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ES	Embriogénesis somática
IES	Inducción de embriogénesis somática
Kin	Kinetina
m³r	Metros cúbicos por rollo
rpm	Revoluciones por minuto
WPM	Medio Woody Plant Lloyd & McCown, 1980.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Bhattacharyya R. & Bhattacharyya S. 2001. In vitro multiplication of *Coleus forskohlii* Briq.: an approach towards shortening the protocol. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 37: 572-575.
- Cailloux F., Julián-Guerrier J., Linossier L. & Coudret A. 1996. Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. Plant Science 120: 185-196.
- Cassells A.C. 1991. Problem in tissue culture: culture contamination. En: P. Debergh y R. Zimmerman (Eds), Micropropagation (pp 31-45) Kluwer Academia Publishers, Dordrecht.
- Chakravarty T., Norcini J.G., Aldrich J.H. & Kalmbacher R.S. 2001. Plant regeneration of creeping bluestem (*Schizachyrium scoparium* (Michx.) Nash Var. *Stoloniferum* (Nash) J. Wipff) via somatic embryogenesis. In Vitro Cell Dev Biol Plant 37: 550-554.
- Cibrián D., Méndez J.T., Campos R., Yates H., Flores J. 1995. *Hypsypyla grandella* (Zeller), Insectos forestales de México. pp 112-117.
- Compton M.E. & Preece J.E. 1986. Exudation and explant establishment. News Int Assn Plant Tissue Cult 50: 9-18.
- Compton M.E. & Preece J.E. 1991. Problems with plant exudation in micropropagation. En: Biotechnology in agriculture and forestry (Eds) YPS Bajaj, Springer Verlag, Berlín. 17:169.
- CONAFOR. 2005. Manual Práctico para la producción de planta. 197p.
- Corbineau F., Defresne P. & Come D. 1985. Algunas características de la germinación y crecimiento de *Cedrela odorata* L. Bois et Forest des Tropiques. No. 208. 11p.
- Das M. & Raychaudhuri S.S. 2001. Enhanced development of somatic embryos of *Plantago ovata* Forsk. by additives. In Vitro Cell Dev Biol

Plant 37: 568-571.

Deberg P.C. & Read P.E. 1991. Micropropagation: In Micropropagation technology and application (Deberg, P. C. & R. Zimmerman). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. p. 1-13.

Dhanalakshmi S. & Lakshmanan K.K. 1991. *In vitro* Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Clitoria ternatea*. J. Exp. Bot 43(247): 213-219.

Dodeman V.L., Ducreux G. & Kreis M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. J. Exp. Bot, 48: 1493-1509.

Echenique V., Polci P. & Mroginski L. 1996. Plant regeneration in weeping lovegrass, (*Eragrostis curvula*) through inflorescence culture. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 46: 123-130.

Gamborg O.L., Miller R.A. & Ojima K. 1968. Plant cell culture nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. Exp. Cell. Res. 50: 151-158.

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 111p.

George E.F. & Sherrington P.D. 1986. Plant propagation by tissue culture. Hand book and directory of commercial laboratories. London: Exegetics Ltd. 709p.

Goldberg R.B., Depaiva G. & Yadegari R. 1994. Plant embryogenesis: zygote to seed. Science 266: 605-614.

Gupta P.K. & Durzan D.J. 1987. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. Biotechnology 5: 147-151.

Gupta S.C. & Agrawal V. 1992. Micropropagation of Woody Taxa and Plant

- Productivity. En: Prasad, B.N; Ghimire, G.P.S. & Agrawal, V.P. (Eds.), Role of Biotechnology in Agriculture, Kathmandu, Nepal. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, p. 37-52.
- Herrera Z. y Lanuza B. 1997. Ficha sobre información de cedro. Revista Forestal Centroamericana. Costa Rica.
- Hicks G. S. 1980. Bot. Rev. 46:1-23.
- INEGI 1995. Producción forestal de México. VII Censo Agropecuario, 1991. Colegio de Postgraduados. México. 170p.
- INEGI 1997. *Explotación de pino en el estado de Durango*. México. 51p.
- Jiménez E. 1998. Generalidades del Cultivo *in vitro*. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Cuba, 390p.
- Jimenez E. 1998. Propagación vía organogénesis. Fase 0 o preparativa. Fase I: establecimiento o iniciación de los cultivos. Curso Internacional de Propagación Masiva *in Vitro* de Especies Vegetales. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 134p.
- Kitto, S. L. 1997. Comercial micropropagation. HortScience. Vol 32 (6).
- Konan N.K., Sangwan R.S. & Sangwan B.S. 1993. Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Plant Cell Tiss. Organ Cult 6: 229-234.
- Litz R.E. y Jarret R. L. 1991. Regeneración de Plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En Roca W. M. y Mroginski L. A. Cultivo de tejidos en la agricultura (p 143-171) CIAT. Colombia.
- Litz R.E., Moon P.A. & Chávez V.M. 1994. Somatic embryogenesis from leaf callus derived from mature trees of the cycad *Ceratozamia hildae* (Gymnospermae). Plant Cell Tiss Organ Cult 40: 25-31.

- Liu Q.C., Zhai H., Wang Y y Zhang D.P. 2001. Efficient plant regeneration from embryogenic suspension cultures of sweetpotato. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 5564-567.
- Lloyd G. & McCown B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30:421-427.
- Marín T. 1998. Inducción de Respuestas Morfogénicas in vitro en *Mamillaria san angelensis* Sánchez-Mejorada especie en peligro de extinción. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. México. 74p.
- Maruyama E., Kinoshita I., Ishii K., Shigenaga H., Ohba K. & Saito A. 1997. Alginate encapsulated technology for the propagation of the tropical forest trees: *Cedrela odorata* L., *Guzuma crinita* Mart. And *Jacaranda mimosaeifolia* D. *Don Silvae Genética*, 46(1): 17-23.
- McComb J. A. & Newton S. 1981. Propagation of kangaroo paws using tissue culture. *J. Hortic. Sci.* 56: 181-183.
- Merkle S. A., Parrot W. A. & Flinn B. S. 1995. Morphogenetic Aspects of Somatic Embryogenesis T.A. Thorpe(ed) En: *in Vitro Embryogenesis in Plants* (pp 155-203) Kluwer Academic Publisher. Netherlands.
- Muñoz S. 2003. Embriogénesis somática en Cedro (*Cedrela odorata* Linnaeus) a partir de cotiledones. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 111p.
- Murray D. R. 1988. Nutrition of the Angiosperm Embryo. John Wiley & sons Ltd. New York. pp. 121-205.
- Navarro C y Vázquez W. 1986. Variabilidad genética en semillas y plantas de *Cedrela odorata* L. Costa Rica, CATIE. 12p.
- Nemeth G. 1979. *Z. Pflnzenphysiol.* 95: 389-396.
- Patiño F. 1997. Recursos Genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los Neotrópicos. Propuestas para Acciones Coordinadas. Organización

- de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 58p.
- Pennington T. D. y Sarukhán J. 1998. Árboles Tropicales de México, Manual para la identificación de las principales especies. UNAM-FCE. México, 521p.
- Pérez C. 2000. Técnicas de Muestreo Estadístico. Alfaomega. México. 603p.
- Pérez J., Mesén F., Hijle, L. y Aguilar M.E. 2002. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L., Revista Forestal Centroamericana. 38: 67-71.
- Quevedo A. 1995. El ataque de *Hypipyla grandella* en cedro y caoba, formas de control. Agro Enfoque. Lima, Perú. 76: 24-25.
- Riveros L. 1998. Respuesta de 5 especies forestales *Jacaranda mimosifolia*, *Swietenia macrophylla*, *Cedrela odorata*, *Caesalpinia spinosa* y *Spathodea campanulata* a diversas técnicas de injerto como base para la proliferación precoz. Tesis para optar por el Título de Ingeniero Forestal. UNALM-Perú.
- Rodríguez B., Gutiérrez A. y Santacruz F. 1996. Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales en agaváceas para zonas áridas. En Izquierdo J., Palomino G. Técnicas convencionales y biotecnológicas para la propagación de plantas de zonas áridas. Serie: Zonas áridas y semiáridas #9, FAO/PUMA. Santiago, Chile. pp. 57-86.
- Ruíz T. 2000. Regulación de la Expresión Morfogenética *in vitro* de un árbol maderable de interés económico (*Cedrela odorata*). Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 64p.
- Sánchez V., Jasso J., Vargas J, López J., Marín T., Parraguirre C. y Díaz E. 2006. Avances en la investigación sobre la tolerancia de *Cedrela odorata* L. al barrenador de brotes *Hypsipyla grandella*. 2ª. Reunión de Barrenadores de las Meliáceas. Veracruz.

- Santarem E. R., Pelissier B. & Finer J. J. 1997. Effect of explant orientation, pH, Solidifying Agent and Wounding on Initiation of Soybean Somatic Embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 33: 13-19.
- SEMARNAT. 2004. Anuario estadístico de la producción forestal 2004. 153p.
- Singh H. 1978. Embryology of gymnosperms. En: Zimmerman W, Carlquist Z, Ozenda P & Wulff HD (eds) *Handbuch der Pflanzenanatomie* (pp 187-241) Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- Soares M. G., Batista-Pereira L. G., Fernández J. B., Correa A. G., Vieira M. F., Rodrigues E. & Oaci O. S. 2003. Electrophysiological responses of female and male *Hysipyla grandella* (Zeller) to *Swetenia macrophylla* essential oils. *J. Chem. Ecol.* 29(9): 21 43-51.
- Stevenson J. H., Harris R. E. 1980. In vitro plantlet formation from shoot-tip explants of *Fuchsia hybrida* cv. Swingtime. *Can J Bot* 58:2190-2192.
- Tang W., Guo, Z. & Ouyang F. 2001. Plant regeneration from embryogenic cultures initiated from mature loblolly pine zygotic embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 37: 558-553.
- Tisserat B., Esan E. & Murashige T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1:1-78.
- Tykarska T. 1976. Rape embryogenesis. I. The proembryo development. *Acta Soc. Bot. Poloniae* 45, 3-16.
- Tykarska T. 1979. Rape embryogenesis. II. Development of embryo proper. *Acta Soc. Bot. Poloniae* 48: 391-421.
- Tullume C. 2000. Características anatómicas y propiedades físico mecánicas del Cedro (*Cedrela odorata* L.) proveniente de Satipo. Tesis de Licenciatura. UNALM. Perú.

- Uribe I. 1998. Influencia de distintos antioxidantes sobre la brotación y crecimiento *in vitro* en ceiba (*Ceiba pentandra*). Tesis de Licenciatura. Fac. Química. UNAM. 69p.
- Vázquez C., Orozco A., Rojas M., Sánchez Nombre, Cervantes V. 1997. La reproducción de las plantas: Semillas y Meristemas. FCE.
- Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachock J. & Filonova L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell* 69: 233-249.
- West M.A.L. & Harada J.J. 1993. Embryogenesis in higher plants: An overview. *The Plant Cell* 5: 1361-1369.
- Zimmerman J. L. 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell*. 5: 1411-1423.