



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**“ESCALAMIENTO DE LA PROPAGACIÓN DE  
CEDRO ROJO (*Cedrela odorata* L.)” EN SISTEMAS  
DE INMERSIÓN TEMPORAL”**

Tesis que presenta

**ANGÉLICA SEGURA ROSEL**

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)**

**Mérida, Yucatán, México**

**Enero 2015**





**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



### **RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “**ESCALAMIENTO DE LA PROPAGACIÓN DE CEDRO ROJO (*Cedrela odorata* L.)**” EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Manuel Robert Díaz, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias (Ciencias Biológicas) de este Centro.

Atentamente,

---

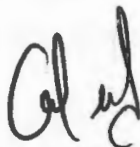
**Dr. Manuel Martínez Estevez**

**Director de Docencia**



## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



ANGÉLICA SEGURA ROSEL

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por la beca de manutención (240245)

Al Centro de Investigación Científica por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones dentro de la unidad de Biotecnología y a los investigadores que me enseñaron a apreciar más de cerca esta área de la investigación

A mi director de tesis Dr. Manuel L. Robert por el apoyo académico que hicieron posible la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial Dr. Manuel L. Robert Díaz, Dra. Nancy Santana Buzzy, Dra. Lourdes Iglesias Andréu así como al Dr. Luis Saénz Carbonell por sus críticas y sugerencias durante las presentaciones de mis exámenes tutorales.

Al comité evaluador integrado por el Manuel L. Robert Díaz, Dra. Nancy Santana Buzzy, Dra. Lourdes Iglesias Andréu, Dra. Clelia de la Peña Seaman así como al Dr. Luis Saénz Carbonell por sus críticas y sugerencias que llevaron a la mejora de este trabajo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Kelly Monja Mío por su valioso apoyo dentro del laboratorio y enseñanzas durante mi formación, al igual me queda agradecerle al M. en C. Juan Juárez por su paciencia y sus valiosas aportaciones a este trabajo al igual que el Ing. Israel García por su ayuda técnica dentro del laboratorio y durante las salidas de campo.

Al M. en C. Miguel Herrera por su ayuda durante la toma de imágenes de todo el proceso llevado a cabo dentro del laboratorio y por su orientación.

A la M. en C. Ileana Carrillo Segura por su valiosísima ayuda, te agradezco infinitamente tu apoyo en todos los aspectos.

A todos mis compañeros de la maestría que hicieron más amena cada clase y plática dentro y fuera del salón de clases.







ÍNDICE.....	i
LISTADO DE FIGURAS .....	iv
LISTADO DE TABLAS .....	v
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	5
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	5
1. Generalidades de la especie .....	7
1.1. Descripción botánica, distribución y ecología .....	7
1.2. Importancia económica e usos .....	8
1.2.1. Importancia del cedro en las plantaciones forestales .....	9
1.3. Problemáticas del cultivo de cedro .....	7
1.4. Alternativas biotecnológicas .....	10
1.4.1. Cultivo <i>in vitro</i> .....	9
1.4.1.1. Micropropagación <i>in vitro</i> .....	11
1.4.2. Reguladores de crecimiento .....	10
1.4.3. Medios de cultivo .....	12
1.4.4. Micropropagación en medio semisólido .....	12
1.4.5. Micropropagación en medio líquido .....	14
1.5. Sistemas de inmersión temporal .....	14

1.5.1. Sistemas de inmersión temporal RITA® .....	16
1.5.2. Biorreactor modular de inmersión temporal BIOMINT®.....	17
1.6. Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i> de cedro rojo .....	19
1.7. JUSTIFICACION .....	19
1.8. OBJETIVOS .....	20
1.8.1. Objetivo general.....	22
1.8.2. Objetivos específicos .....	22
1.9. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.....	23
1.10. BIBLIOGRAFÍA.....	24
<b>CAPÍTULO II. SELECCIÓN DE ÁRBOLES PLUS PARA LA OBTENCIÓN DE SEMILLAS , COLECTA DE SEMILLAS Y GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>31</b>
2.1. INTRODUCCIÓN.....	31
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
2.2.1. Selección de los árboles de cedro rojo para la obtención de semillas ...	33
2.2.2. Axenificación y germinación de semillas en medio semisólido y en biorreactores BIOMINT® .....	34
2.2.3. Análisis estadístico .....	34
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
2.3.1. Selección de los árboles de cedro rojo para la obtención de semillas ...	37
2.3.2. Axenificación y germinación de semillas en medio semisólido y en biorreactores BIOMINT ® .....	38
2.4. CONCLUSIONES .....	38
2.5. BIBLIOGRAFÍA .....	39

<b>CAPITULO III. ESTABLECIMIENTO DE TIEMPOS Y FRECUENCIAS DE INMERSIÓN/AIREACIÓN ADECUADOS PARA LA INDUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE EXPLANTES NODALES EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL RITA® .....</b>	<b>41</b>
3.1. INTRODUCCIÓN .....	41
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	43
3.2.1. Establecimiento de los tiempos de inmersión/aireación para la inducción de yemas en sistemas de inmersión temporal RITA® .....	43
3.2.2. Selección de explantes para la inducción de yemas axilares y cotiledonares en sistemas de inmersión temporal RITA® .....	44
3.2.3. Multiplicación de yemas preexistentes en sistemas de inmersión temporal RITA® .....	45
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
3.3.1. Establecimiento de los tiempos de inmersión/aireación para la inducción de brotes en sistemas de inmersión temporal RITA® .....	47
3.3.2. Selección de explantes para la inducción de yemas axilares y cotiledonares en sistemas de inmersión temporal RITA® .....	51
3.3.3. Multiplicación de brotes preexistentes en sistemas de inmersión temporal RITA® .....	54
3.4. CONCLUSIONES .....	62
3.5. BIBLIOGRAFÍA .....	63
4.1. DISCUSIÓN GENERAL .....	65
4.2. PERSPECTIVAS GENERALES .....	67
4.3. BIBLIOGRAFÍA .....	68
<b>ANEXOS .....</b>	<b>70</b>

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol adulto, fruto, flor, hojas y madera.	6
<b>Figura 2.</b> Funcionamiento del biorreactor RITA®	15
<b>Figura 3.</b> Sistema BIOMINT®	17
<b>Figura 4.</b> Ubicación de las áreas de muestreo en los municipios de Mérida y Valladolid.	30
<b>Figura 5.</b> Figura 5. A) Semillas; B) Axenificación con antifúngicos y con cloro; C) Sembrado de las semillas en medio semisólido; D) Magenta con semillas	32
<b>Figura 6.</b> Árbol élite seleccionado, frutos colectados en Valladolid y secado de los frutos.	35
<b>Figura 7.</b> Plántula germinada <i>in vitro</i> de 3 meses.	44
<b>Figura 8.</b> Medición de raíces de explantes provenientes de sistemas RITA®	46
<b>Figura 9.</b> Inducción de yema en sistemas RITA®	48
<b>Figura 10.</b> Inducción de brotes en la yema 1 sin regulador a las 6 semanas, inducción de la yema 1 a las 6 semanas con dicamba (13.57 $\mu$ M).	53
<b>Figura 11.</b> Inducción de brotes en sistemas RITA® a diferentes frecuencias de inmersión sin regulador de crecimiento.	54
<b>Figura 12.</b> Multiplicación de yemas en sistemas RITA® de la yema 1 a una frecuencia de 4 horas.	59
<b>Figura 13.</b> Elongación y enraizamiento de brotes <i>in vitro</i> en sistemas RITA® a diferentes frecuencias de inmersión.	60
<b>Figura 14.</b> Aclimatización de plántulas <i>in vitro</i> .	61

**LISTADO DE CUADROS**

<b>Cuadro 1.</b> Características morfológicas de los individuos muestreados.	34
<b>Cuadro 2.</b> Porcentaje de contaminación y germinación en los tratamientos de axenificación evaluados.	36
<b>Cuadro 3.</b> Porcentaje de germinación y contaminación de semillas en medio semisólido y medio líquido.	37
<b>Cuadro 4.</b> Tiempo y frecuencia de inmersión para la inducción de yemas en sistemas RITA®	43
<b>Cuadro 5.</b> Frecuencias de inmersión empleadas en la inducción y multiplicación de 3 yemas en sistemas RITA®	45
<b>Cuadro 6.</b> Porcentaje de la respuesta de inducción en sistemas RITA® a las 4 y 6 semanas.	49
<b>Cuadro 7.</b> Porcentaje de hiperhidratación de brotes según la frecuencia de inmersión en sistemas RITA® a las 4 y 6 semanas.	50
<b>Cuadro 8.</b> Porcentajes de brotación a las 6 semanas en los diferentes tipos de yemas, frecuencias de inmersión y dicamba (13.57 $\mu$ M).	52
<b>Cuadro 9.</b> Número promedio de yemas inducidas a diferentes frecuencias de inmersión.	53
<b>Cuadro 10.</b> Multiplicación de yemas en sistemas RITA® con diferente número de yema y frecuencias de inmersión.	56

## LISTADO DE CUADROS

---

**Cuadro 11. Tamaño promedio de brotes provenientes de diferentes tratamientos y frecuencias de inmersión.** 58

**Cuadro 12. Tamaño promedio de raíces, número de brotes aclimatados y porcentaje de aclimatación.** 58



## RESUMEN

Entre las especies de alto valor comercial se encuentra el cedro rojo (*Cedrela odorata* L.), la cual destaca por la calidad y durabilidad de su madera, asimismo de ser resistente al ataque de termitas y la pudrición. Sin embargo, esta especie enfrenta diversas problemáticas, como la reducción de su población en el medio natural por tala selectiva, lo que ha propiciado que sea incluida dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 como especie bajo protección especial. Actualmente, aunque existe una producción forestal constante a través de técnicas de propagación tradicional usando semillas y esquejes, esta especie aún no ha sido sometida a una domesticación intensa, lo cual dificulta la obtención de plantas con las características deseadas demandadas por el mercado. Como alternativa a las técnicas tradicionales de propagación, el empleo actual de métodos biotecnológicos como la micropropagación *in vitro* permite lograr volúmenes considerables de plantas seleccionadas y establecer plantaciones mejoradas a corto plazo.

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer una metodología para determinar los parámetros adecuados en cada una de las etapas de micropropagación en sistemas de inmersión temporal. Para ello se seleccionaron árboles con características destacadas, de los cuáles se colectaron alrededor de 10,000 semillas para la obtención de plántulas *in vitro*. La elección del explante es uno de los principales factores de estudio para la micropropagación, por lo que refiere a este trabajo la yema cotiledonar demostró ser el mejor candidato al presentar un 100% de respuesta en la etapa de inducción a las 4 semanas. En la multiplicación se obtuvo un promedio máximo de 4 brotes por explante en un tiempo de inmersión de 1 minuto cada 12 horas a las 8 semanas, esto nos indica que el aumento del tiempo entre cada frecuencia favorece un mayor proliferación de yemas. El crecimiento de los brotes *in vitro* es importante para su sobrevivencia en el medio exterior, en este caso se obtuvo hasta un tamaño de 4.3 centímetros en una frecuencia de 8 horas en la yema cotiledonar, quedando demostrado nuevamente ser un explante adecuado para la propagación *in vitro*. Durante la elongación se presentó el crecimiento de raíces en varios brotes alcanzando un tamaño promedio máximo de 2.3 cm y aclimatación hasta de un 96%.

Este trabajo representa un primer paso en la optimización en la propagación *in vitro* de esta especie, mediante el uso de sistemas de inmersión temporal, ya que estos sistemas elevan el nivel de mecanización, con lo que se reducen muchos de los problemas que existen en el sistema semisólido, permitiendo un aumento en las tasas de multiplicación y mejora del porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de las plantas en la etapa de aclimatación.





**ABSTRACT**

Among the species of high commercial value is red cedar (*Cedrela odorata* L.), which stands for quality and durability of its wood also be resistant to termites and rot. However, this species faces various problems, such as the reduction of its population in the wild by selective logging, which has led it to be included within the NOM-059-SEMARNAT-2010 as a species under special protection. Currently, although there is a constant forestry production through traditional breeding techniques using seeds and cuttings, this species has not yet been subjected to intense domestication, which hinders the production of plants with desired characteristics demanded by the market. As an alternative to traditional propagation techniques, the current use of biotechnological methods such as *in vitro* micropropagation can achieve considerable volumes of selected plants and establish improved to short term plantation

This study aimed to establish a methodology for determining appropriate in each of the stages of micropropagation in temporary immersion systems parameters. To do trees with outstanding features, of which about 10,000 seeds were collected to obtain plantlets *in vitro* were selected. The choice of explant is one of the main factors for micropropagation study, which refers to this work cotyledonary bud proved to be the best candidate to submit a 100% response in the induction stage 4 weeks. In multiplying a maximum average of 4 shoots per explant was obtained in an immersion time of 1 minute every 12 hours at 8 weeks, this indicates that increasing the time between each frequency favors a greater proliferation of buds. Growth *in vitro* shoot is important for survival in the external environment in this case was obtained to a size of 4.3 cm at a frequency of 8 hours in the yolk cotyledonar, being shown again be a suitable explant for propagation *in vitro*. During elongation root growth occurred in several outbreaks peaking average size of 2.3 cm and acclimatization to 96%.

This work represents a first step in optimizing the *in vitro* propagation of this species, using temporary immersion systems, as these systems raise the level of mechanization, so many of the problems in reducing the semisolid system, allowing an increase in the rates of multiplication and rooting percentage improvement and survival of plants in the acclimatization stage.



## INTRODUCCIÓN

Los árboles tropicales maderables son de gran importancia económica y juegan un papel fundamental dentro de la ecología de un ecosistema. Alrededor del mundo existen más de 600 especies de maderas preciosas, las cuales presentan diversos usos. Dentro de estos árboles se destacan los pertenecientes a la familia Meliáceae, que cuenta con 50 géneros y más de 1000 especies en el mundo. Aunque existe un gran número de especies que tienen un valor potencial como productoras de madera, solamente se emplean de forma extensiva algunas de ellas, principalmente los géneros *Swietenia* y *Cedrela* (Patiño, 1997). Entre las especies del género *Cedrela*, se destaca el cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) gracias a la calidad y durabilidad de su madera, además de ser resistente al ataque de termitas y la pudrición y es ampliamente usada en carpintería y ebanistería fina (Lam, 2009).

En las últimas décadas las poblaciones de caoba (*Swietenia macrophylla* K.) y cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) han sido afectadas por diversos factores como la deforestación, el ataque del barrenador (*Hypsiphyla grandella*) y la erosión genética (Patiño, 1997). Los procesos de deforestación y el aprovechamiento selectivo de los mejores individuos, produce una reducción en las poblaciones naturales y afecta la constitución genética de las mismas (Patiño, 1997).

Actualmente, para compensar la problemática causada por la tala selectiva, se ha implementado el uso de plantaciones forestales y en México se reportó más de 140,000 hectáreas de dichas plantaciones en 2007, de las cuales aproximadamente en la mitad de ellas se plantaron cedro y caoba. Sin embargo, lo anterior no asegura que el material producido dentro de estas plantaciones sea el adecuado para la industria forestal, ya que principalmente el material utilizado proviene de semilla (Quijano, 2011). En la actualidad, el empleo de métodos biotecnológicos para lograr volúmenes considerables de plantas seleccionadas y poder establecer plantaciones mejoradas a corto plazo es una alternativa que debe ser más explotada en esta especie. (Rodríguez *et al.* 2003).

De las técnicas biotecnológicas, la más factible a corto plazo para el sector forestal es la micropropagación, ya que presenta ventajas de una inmediata aplicación de un sistema

de propagación dirigido a la producción comercial de clones seleccionados, a la producción de propágulos provenientes de semillas en familias superiores, en programas de reforestación usando plántulas uniformemente genéticas, al aumento de la productividad por medio de la captura del vigor híbrido y además constituye una herramienta para los programas de conservación de los recursos genéticos forestales y de mejoramiento genético, ya que es la base para la aplicación de técnicas de transformación genética (Rodríguez, 2003).

En cedro se han realizado diversos estudios de micropropagación utilizando como explante plántulas provenientes de semillas y el medio semisólido como principal forma de propagación. Sin embargo el uso de este tipo de medio presenta diversas desventajas entre las que destaca su alto costo de producción por la mano de obra requerida, el uso de agentes gelificantes y las pérdidas sufridas durante la aclimatización (Smith, 2000). Reportes de otras especies tropicales sugieren que los sistemas de inmersión temporal pueden mejorar la propagación incrementando el número y la calidad de las plantas micropropagadas (Peña *et al.*, 2010). Por lo cual es necesario optimizar las condiciones adecuadas para la propagación de esta especie en sistemas de inmersión temporal y en un futuro puedan ser aplicadas en la propagación masiva de plantas que permitan la reproducción fiel de las características deseadas.



## **CAPÍTULO I. ANTECEDENTES**

### **1. Generalidades de la especie**

#### **1.1. Descripción botánica, distribución y ecología**

El cedro es una especie caducifolia, que pierde sus hojas entre los meses de enero y mayo. Es un árbol que alcanza hasta 35 metros de altura y 1.70 m. de diámetro en el tronco en zonas con alta precipitación pluvial (Pennington *et al.*, 2005).

Posee una corteza fisurada de color café rojiza y desprende un olor amargo al corte, las yemas de 3 a 5 mm de largo, son ovoides, agudas, rodeadas por varias escamas ovadas y pubescentes, las estípulas están ausentes. Posee hojas dispuestas en espiral, paripinnadas o imparipinnadas, de 15 a 50 cm incluyendo el pecíolo, están compuestas por 10 a 22 folíolos opuestos o alternos, lanceolados u oblongos, asimétricos con el margen entero, ápice acuminado, base muy asimétrica. Es una especie monoica, es decir posee flores masculinas y femeninas en la misma inflorescencia que se encuentran en panículas terminales de 15 a 30 cm de largo, con pedicelos de 1 a 2 mm de largo. Las flores suavemente son perfumadas. Los frutos son cápsulas de 2.5 a 5 cm de largo con formas elipsoidales a oblongas y estas infrutescencias pueden alcanzar hasta 30 cm y contener alrededor de 30 semillas (Figura 1) (Pennington *et al.*, 2005).

Se encuentra distribuida en la vertiente del golfo, desde Tamaulipas hasta Yucatán y en la vertiente del pacífico, desde Sinaloa hasta Guerrero. Forma parte del bosque tropical perennifolio (selva alta perennifolia) y subcaducifolio (selva alta y mediana subcaducifolia). Puede presentarse en suelos calizos o volcánicos, pero con buen drenaje y desde el nivel del mar hasta los 1500 msnm. Alcanza los máximos tamaños en zonas con precipitación pluvial y crece entre 2500 a 4000 mm anuales. En zonas con limitada precipitación pluvial árbol no sedesarrolla tan bien y presenta fustes cortos y frecuentemente torcidos (Badillo *et al.*, 2004). Puede formar parte de la vegetación primaria y secundaria, ya que es una especie pionera y se encuentra frecuentemente en el estrato superior de la selva y en lugares de pastoreo (Castillo *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Árbol adulto, fruto, flor, hojas y madera.

### **1.2. Importancia económica e usos**

Después de la caoba, el cedro es la especie maderable tropical más importante en la industria forestal en México. La madera puede obtener un valor hasta por cinco veces el valor de la madera de las coníferas debido a sus excelentes características, ya que se utiliza para obtener vigas, tablas y chapas, así como para fabricar artículos torneados, para cajas de puros y para hacer tallas (ITTO, 2010).

La madera y los frutos tienen importancia artesanal para la elaboración de artículos torneados y esculturales. El fruto seco tiene un alto potencial artesanal; de acuerdo con la creatividad de quien lo trabaja, ya que se pueden hacer instrumentos musicales, arreglos florales, cortinas y varias cosas más. Las hojas, raíz, corteza, semilla, tallo y exudado del cedro rojo tienen usos medicinales en el centro y sur del país (Dominguez, 2008).

Se recomienda para tratar las molestias dentales, para lo cual se coloca en la parte



afectada un trozo de la raíz molida. También es frecuente su utilización para bajar la temperatura, tratar problemas como diarrea, dolor de estómago y parásitos intestinales, mediante el cocimiento hecho a base de raíz, tallo y hojas. En algunas regiones se emplea para tratar las manchas blanquecinas presentes en la piel, en este caso se colocan las hojas machacadas durante varios días (CONAFOR, 2000)

### **1.2.1. Importancia del cedro en las plantaciones forestales**

Una de las estrategias empleadas para reducir la presión que sufren los ecosistemas forestales, es incrementar la producción a través del establecimiento de plantaciones comerciales. Una plantación forestal comercial es el establecimiento, cultivo y manejo de especies arbóreas, en terrenos agropecuarios que han perdido su vegetación nativa, con el objeto de producir materias primas maderables y no maderables, destinadas a su comercialización o a su industrialización (CONAFOR, 2001).

Debido a su alto valor comercial, su fácil adaptabilidad y sus efectos restauradores al medio ambiente, las plantaciones forestales han proliferado en México, la producción forestal reporta para el año 2008 más de 100,000 hectáreas plantadas con diversas especies de *Eucalyptus*, *Pinus* y *Cedrela odorata* abarcando un porcentaje del 55% de la producción total forestal. *Cedrela odorata* presentó un 20% de superficie total con 20,705 hectáreas (CONAFOR, 2011).

En la península de Yucatán, la tasa de sobrevivencia de estas plantaciones es del 19 al 52%, destacando la mala calidad de la madera. Algunas de estas plantaciones se han establecido en áreas de cantera, permitiendo un aprovechamiento económico y al mismo tiempo presta servicios ambientales (Negreros, 1997; Castillo *et al.*, 2008).

### **1.3. Problemáticas del cultivo de cedro**

El cedro rojo es altamente apreciado en todo el mundo por el alto valor económico que alcanza su madera (Lamb, 1968). A causa de su importancia económica, las poblaciones naturales se han visto afectadas a causa de diversos factores como la deforestación y la selección sobre los mejores individuos, ocasionando una pérdida de material genético importante para la sobrevivencia de esta especie (Albert *et al.*, 2005).

Actualmente para contrarrestar estas presiones, el sector forestal ha aumentado las

plantaciones para depender en mayor medida como fuente de madera industrial (Cuevas, 2005). Una parte del germoplasma que se utiliza en las plantaciones forestales se obtiene por medio de propagación vegetativa a través técnicas de injertado y enraizado de estacas, pero que no se aplicado de forma más extensa debido a las características biológicas de la especie principalmente en la pérdida de las capacidades morfogénicas necesarias para poder efectuar esta forma de propagación, por lo cual se recurre a prácticas artesanales para su rápida multiplicación con el uso de semillas provenientes principalmente de árboles de baja estatura y con fustes muy ramificados, trayendo como consecuencia la selección de genotipos poco favorables (Simula *et al*, 2005; SEMARNAT, 2002; Zobel y Talbert, 1984).

Otro de los problemas dentro de las plantaciones es la susceptibilidad a la que se encuentran expuestos, como al ataque de diversas plagas destacando *Hypsiphyla grandella* Zeller (Insecta:Pyralidae) conocido como el barrenador de las meliáceas. La larva de este insecto se alimenta de la yema apical y laterales destruyéndola. Su acción produce la deformación y bifurcación del tronco, provocando un retraso considerable de crecimiento de la planta afectada y ocasionalmente, la muerte (Patiño, 1997). Esto imposibilita el uso comercial de su madera, eliminando el valor económico del árbol (Briceño-Vergara, 1997). No menos importante a pesar que el barrenador de las meliáceas es una de las plagas más devastadoras, existe otra plaga que afecta al cedro conocido como el barrenador del fuste (*Chrysobothris yucatanensis* (Coleoptera: Buprestidae)). Las larvas se hospedan en plantas que tienen uno a dos años de edad alojándose en la parte basal del tronco, en donde empupan y completan su ciclo de vida. Estas larvas se alimentan al principio de la corteza interna del árbol y parte de la madera, donde la parte muerta es susceptible al ataque de hongos debilitando el fuste (Rodríguez, 1990)

### **1.4. Alternativas biotecnológicas**

Aún existen grandes deficiencias en la producción de árboles de interés comercial a través de las técnicas convencionales de propagación vegetativa. Estas técnicas son llevadas a cabo principalmente usando semillas o esquejes para su propagación y aunque permiten acelerar dicho proceso, hasta ahora no se ha obtenido el éxito deseado debido a los resultados variables con estas formas de propagación, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas herramientas enfocándose en las técnicas biotecnológicas actuales



destacando el papel del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, que permite la producción de plantas elite y así satisfacer la demanda en el mercado y evitar la pérdida de esta especie en su hábitat natural.

#### **1.4.1. Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* puede ser definido como el cultivo de axénico de todo tipo de células, órganos, tejidos, embriones. Sus aplicaciones son varias: regeneración de plantas, obtención de plantas libres de patógenos (Morel y Martin, 1995), conservación de germoplasma (Withers, 1985), producción de metabolitos secundarios (Misawa, 1994), el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro* (Perez et al. 1998).

La respuesta obtenida con el cultivo *in vitro* de un determinado explante decidirá sobre su utilidad para el logro de un objetivo propuesto. Las ventajas de la propagación son generar plantas libres de enfermedades, de alta calidad, vigor, producción ilimitada de genotipos élite, es un proceso predecible por lo que permite planear la producción, puede ser aplicada prácticamente a cualquier especie vegetal, es altamente reproducible y eficiente, mantiene su capacidad proliferativa a través de un gran número de trasplantes, genera plantas genética y fenotípicamente fieles a la planta madre (Cruz et al, 1985).

##### **1.4.1.1. Micropropagación**

La micropropagación es una efectiva herramienta biotecnológica que permite la obtención de grandes cantidades de plantas con el mínimo uso de espacio y menor cantidad de material parental, que en la propagación tradicional (Preece y Read, 2005; Raven et al., 2005).

La micropropagación es útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales para regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados (Raven et al, 2005). Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban (Preece y Read, 2005).

Existen cuatro métodos básicos para propagar plantas *in vitro*. Esto depende de la especie y de las condiciones de cultivo, la propagación se puede lograr por: (1) proliferación de brotes axilares, (2) cultivo de nodos, (3) formación de nuevos brotes adventicios a través de organogénesis o (4) embriogénesis somática (Kane, 2000).

La micropropagación de especies forestales ha tenido muchos avances incluyendo la posibilidad de propagación de masa clonal, rejuvenecimiento y uniformidad de líneas clonales (Martinelli y Aparecido, 2003).

### **1.4.2. Reguladores de crecimiento**

Los reguladores de crecimiento vegetal, fitoreguladores o fitohormonas son compuestos orgánicos que pueden producir efectos notables sobre el metabolismo y el crecimiento aún en pequeñas cantidades y los produce sobre todo en tejidos en crecimiento (George y Sherrington, 1984). Pueden ejercer diversos efectos como: a) estimular el crecimiento longitudinal de las células en la parte de la planta que se encuentran en crecimiento, b) la formación de nuevas raíces especialmente adventicias; c) desarrollo de flores y frutos; d) la inhibición en el desarrollo de los brotes laterales, e) estimular la división celular en el cambium vascular, f) la abscisión o caída de las hojas, flores y frutos, g) afectar el movimiento estomático entre otros procesos (George y Sherrington, 1984).

Hay diversas clases conocidas de hormonas de crecimiento, aunque recientemente se han reconocido 5 grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico. Las auxinas y citocininas son por mucho las más importantes para la regulación del crecimiento y la morfogénesis en el cultivo de células, tejidos y órganos; en estos grupos se han descubierto reguladores sintéticos con actividad biológica, igual o superior a los reguladores de crecimiento naturales (Machakova *et al*, 2008).

La combinación de auxinas y citocininas algunas veces promueven el crecimiento de callos, células en suspensión y órganos; también regulan la dirección de la morfogénesis. La auxina natural presente en mayor abundancia es el ácido indoloacético (IAA), la cual usada en altas concentraciones promueve la formación de raíces adventicias. Entre las auxinas sintéticas se destaca el ácido 2,4 diclorofenoxiacético, que se emplea para promover la formación y crecimiento de callos (Machakova *et al*, 2008).

Las citocininas en forma natural promueven la síntesis de proteínas y la división celular (Duchefa, 2001). Las citocininas utilizadas en el cultivo de tejidos promueven el desarrollo de las yemas laterales latentes e inhibe la dominancia apical. Ejemplo de ello es la 6 bencilaminopurina (BAP) que estimula el desarrollo de yemas axilares (Van Staden *et al.*, 2008).

Las giberelinas promueven la elongación de tallos y hojas, debido en parte a la activación de los meristemos intercalares (Moshkov *et al.*, 2008). En algunas plantas promueven la germinación de semillas, el desarrollo del fruto y contribuyen a la determinación del sexo y al control de la juvenilidad. La GA<sub>1</sub> es la giberelina más activa y promueve la elongación celular. Una de las giberelinas comerciales utilizadas en el cultivo de tejidos es el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) que promueve el alargamiento del tallo (Moshkov *et al.*, 2008)

El ácido absícico juega importantes roles en la planta. Participa en la regulación del cierre de estomas, control en la toma de agua y iones por las raíces, así como en los procesos de abscisión y senescencia de las hojas. En cultivo de tejidos promueve la maduración de embriones somáticos y facilita la aclimatación (Moshkov *et al.*, 2008).

Es bien conocido que el etileno es producido en los tejidos de las plantas y regula su crecimiento. El etileno juega entre otras, un rol importante en la maduración de frutos, senescencia y abscisión de las hojas. En el cultivo de tejidos promueve o inhibe la regeneración adventicia (Duchefa, 2001).

#### **1.4.3. Medios de cultivo**

El medio de cultivo es el sustrato en el cuál se desarrollan células, tejidos y órganos, luego de ser aislado de la planta madre. Estos contienen una combinación de nutrientes como: sales orgánicas, carbohidratos, vitaminas, aminoácidos y agua suplementados con reguladores de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias (Murashige y Skoog, 1962).

El crecimiento y desarrollo de los explantes *in vitro* son producto de factores genéticos, epigenéticos, el ambiente y los componentes del medio de cultivo; este último es más fácil de manipular para fines de cultivo *in vitro* (Trigiano, 2000). La optimización de las condiciones del cultivo resulta en una mejor productividad, no solamente en términos de



número de plantas producidas, sino también en la calidad, que a su vez facilita su crecimiento y aclimatización *ex vitro* (Martinelli y Aparecido, 2003).

Los medios basales más usados para angiospermas son el MS (Murashige & Skoog, 1962) o el WPM (Lloyd & McCown, 1981). Para el caso de gimnospermas, el empleo de medios reducidos en sales minerales y baja cantidad de nitrógeno resulta mucho mejor que el empleo de un medio altamente salino y nitrogenado como el MS.

### **1.4.4. Micropropagación en medio semisólido**

En la práctica, todos los protocolos de micropropagación son establecidos para determinar los componentes del medio (reguladores de crecimiento, nutrientes) y las condiciones ambientales (temperatura, luz) para la inducción de la morfogénesis (George y Debergh, 2003). En su caso la mayoría de los cultivos *in vitro* utilizan como sustrato un medio semisólido, el cual depende de un agente gelificante. Esta técnica es utilizada para la multiplicación de genotipos élite de importancia comercial y especies amenazadas que son difíciles de propagar (George y Debergh, 2003).

El medio semisólido tiene un uso general en muchos procesos de micropropagación, el cuál presenta algunas desventajas. Las condiciones de cultivo son heterogéneas, ya que solo una parte del explante se encuentra en contacto con los nutrientes del medio. Otra desventaja es que en cada etapa del proceso de micropropagación se deben emplear diferentes composiciones en el medio y concentraciones de reguladores de crecimiento, por lo que se requiere asimismo efectuar a menudo diversos subcultivos, lo que eleva los costos de producción de las plantas y esto solo es económicamente viable para especies de alto valor agregado (Robert *et al.*, 2006 b)

A fin de simplificar todo el proceso, reducir los costos de producción y facilitar la micropropagación de un mayor número de especies, es necesario el desarrollo de métodos simples y económicos para disminuir dicha problemática (Robert *et al.*, 2006 b).

### **1.4.5. Micropropagación en medio líquido**

El sistema de cultivo en medio líquido tiene un efecto positivo en la velocidad y en la morfología de brotes, embriones somáticos, microtuberculos o bulbos producidos *in vitro* (Preil, 2005). El medio líquido favorece la organización de los tejidos similares a los de

las plantas acuáticas. Sin embargo, esto puede complicar al final el proceso de propagación así como la aclimatación de los propágulos. Por lo tanto, los pasos tienen que ser adecuados para evitar el fenómeno de hiperhidricidad (vitricación), que constituye el desorden fisiológico más serio que usualmente se presenta en los sistemas de cultivo en medio líquido, aunque también existen otros inconvenientes como la contaminación microbiana y la dificultad en el proceso de escalamiento (Preil, 2005; Robert *et al.*, 2006).

En comparación con el sistema semisólido, el sistema líquido es más adaptable a la automatización, lo que permite la reducción en la mano de obra y los costos, ya que este tipo de medio de cultivo puede ser cambiado durante el proceso de escalamiento al igual que la limpieza de los recipientes de cultivo se simplifica y no necesita de uso de agentes gelificantes. Los sistemas de inmersión temporal juegan un papel dominante en la micropropagación de plantas (Preil, 2005).

### **1.5. Sistemas de inmersión temporal**

Un sistema de inmersión temporal es un cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos vegetales expuestos periódicamente a un medio de cultivo líquido en biorreactores automatizados bajo condiciones controlada (Minagri, 2005).

El principio básico de funcionamiento de los sistemas de inmersión temporal se basa en la posibilidad de absorción de nutrientes y otras sustancias por las plantas durante períodos alternos de inmersión en un medio de cultivo líquido y posterior permanencia en el recipiente sin el medio de cultivo (aunque sí con una atmósfera de una elevada humedad relativa), este proceso de nutrición alternativa suministra los elementos necesarios al material vegetal e incrementa notablemente la oxigenación del medio interno, influyendo positivamente en el crecimiento y multiplicación de las plantas (Mulet *et al.*, 1999).

El uso de un sistema de inmersión temporal permite elevar el nivel de mecanización del proceso, con lo que reduce el uso de mano de obra, reactivos y agentes gelificantes, disminuyen los niveles de contaminación y manipulación de explantes, aumentan las tasas de multiplicación y mejora el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de las plantas en la etapa de aclimatización (Minagri, 2005).

Existen actualmente disponibles distintos sistemas de inmersión temporal, destacando entre ellos el sistema RITA® (Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado) desarrollado por Alvard y colaboradores (1993) y el BioMINT® (Biorreactor Modular) desarrollado por Robert y colaboradores (2006 a).

### **1.5.1. Sistemas de inmersión temporal RITA®**

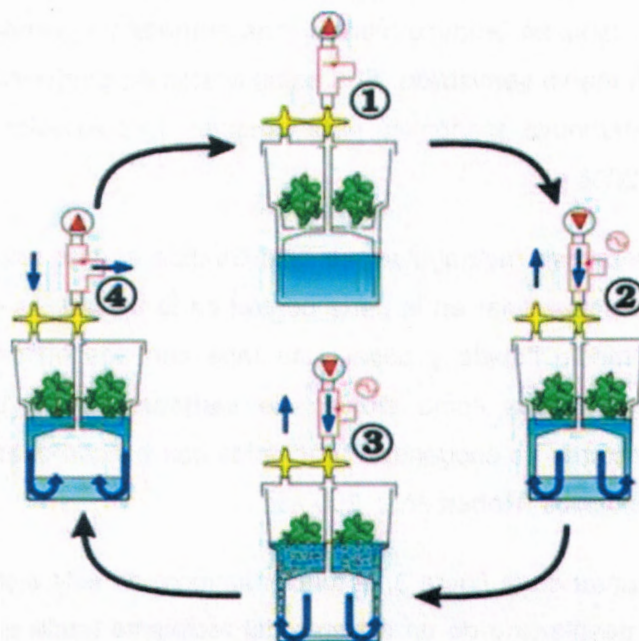
Uno de los sistemas de inmersión temporal más sofisticado fue desarrollado en Francia por Alvard *et al* (1993), posteriormente fue modificado por Teisson y Alvard (1995). Estos autores diseñaron un biorreactor llamado RITA® (Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado), el cuál funciona con un software que controla el tiempo y período de inmersión.

El equipo consta de un vaso que contiene el medio nutritivo y una base de plástico a media altura con orificios que soporta una esponja de poliuretano donde se colocan los explantes, además de una conexión vertical que está al centro del vaso, por la cual entra y sale el flujo de aire que proporciona la bomba compresora. Este sistema, es automatizado con el reloj de una computadora que permite la programación de los tiempos de inmersión y aireación del sistema, mediante un dispositivo de distribución de aire con una electro-válvula de tres vías que está directamente conectada a la bomba compresora inyectando un litro de aire por minuto a una presión de 0,2 bar. El aire que entra en cada biorreactor es esterilizado por filtros (Teisson y Alvard, 1995).

El funcionamiento del equipo (Figura 2) una vez instalado adecuadamente, se coloca los explantes sobre el disco de poliuretano y se mantienen en dos diferentes fases:

*Fase emergida:* Esta fase es la de mayor duración donde el explante se mantiene libre del medio líquido y regularmente las horas dependen de la especie.





**Figura 2.** Funcionamiento del biorreactor RITA®. 1) Explantes colocados sobre un disco de esponja de poliuretano; 2) La sobrepresión de aire estéril, aplicada en la parte baja, permite al medio de cultivo subir a la parte alta donde se encuentran los explantes 3) El aire inyectado permite la oxigenación del medio; 4) Cuando haya terminado el tiempo de inmersión la presión disminuye y el medio de cultivo desciende a la parte inferior del recipiente (Tomado de VITROPIC S.A, RITA® <http://pagesperso-orange.fr/vitropic/rita/es/fonction.htm>)

**Fase sumergida:** La duración de esta fase se define por experimentación pero siempre es corta.

Una sobrepresión de aire estéril, aplicada en la parte baja del recipiente, permite al medio de cultivo subir a la parte alta donde se encuentran los explantes. El aire inyectado permite la oxigenación del medio. Pasado el tiempo de inmersión, la bomba de aire se apaga. Las presiones se equilibran, y el medio baja por gravedad a la base del vaso.

### 1.5.2. Biorreactor modular de inmersión temporal BIOMINT®

El biorreactor modular de inmersión temporal (BioMINT®), opera bajo el mismo principio de todos los sistemas inmersión temporal, pero sin requerir flujo de aire, como sucede en otros sistemas (Robert *et al*, 2006 b).

El BioMINT® puede ser usado para todas las etapas del proceso de micropropagación *in vitro* en muchas especies. Con esto se reduce la cantidad de mano de obra necesaria para la transferencia de plantas y el período de tiempo necesario para algunas etapas de

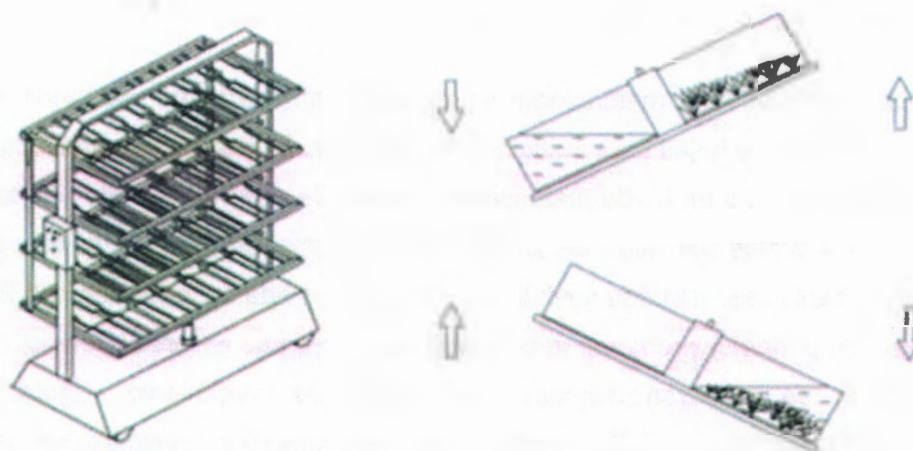
la micropropagación, también produce plantas más grandes y vigorosas en comparación con los cultivados en medio semisólido. Sus bajos costos de producción y la eficiencia lo convierten en una alternativa económica para especies de bajo valor agregado como el agave (Robert *et al*, 2006 a).

El BioMINT® es una unidad rectangular que está dividida en tres secciones a través de divisores que permiten mantener en la parte central de la unidad los explantes y en uno de los extremos al medio líquido y posee una tapa con dos orificios que permite un intercambio pasivo de gases como dióxido de carbono, etileno u otras sustancias químicas. Los biorreactores se encuentran fabricados con policarbonato y son totalmente autoclaveables y traslúcidos (Robert *et al*, 2006 a).

Como se puede observar en la figura 3, el funcionamiento de este sistema es sencillo, el medio de cultivo es desplazado de un extremo del recipiente hacia el otro por gravedad cuando los biorreactores cambian su inclinación, que es llevado a cabo en el sistema S y B (Sube y Baja). La unidad electromecánica consiste en un juego de cuatro plataformas en el cuál pueden ser colocados hasta 9 biorreactores. La plataforma está unida a una estructura de soporte por su punto medio y sus bordes libres tienen posiciones alternas, moviéndose hacia arriba y abajo, impulsados por un pistón conectado a un motor eléctrico. El sistema entero es controlado automáticamente a través de un panel de control programable que regula el tiempo y la velocidad del cambio de posición de la plataforma (Robert *et al.*, 2006 a).

La ventaja de este sistema comparado con otros sistemas de cultivo *in vitro*, es que le permite combinar la aireación con la inmersión del explante, sometiéndolos al tiempo y período de inmersión requerido para que la planta se desarrollen vigorosamente, haciéndolo más eficiente. Como todos los sistemas presentan diversas problemáticas siendo una de las más importantes la contaminación microbiana del medio de cultivo líquido, ya que se dispersa a todas las plantas. Sin embargo, la contaminación es más fácilmente controlable en biorreactores modulares que en otros grandes sistemas, esto es porque hay un menor número de plantas expuestas a la contaminación (Robert *et al.*, 2006 a).





**Figura 3.** Sistemas BioMINT®. A la izquierda se muestra el equipo de soporte utilizado para los BioMINT® llamado SyB (sube y baja) y a la derecha el recipiente BioMINT®. Imagen tomada a partir de Robert *et al.*, (2006 b)

Actualmente, en este sistema se realizan estudios de micropropagación en agave, chile habanero y caña de azúcar. Peña y colaboradores (2010) desarrollaron un protocolo para la elongación y enraizamiento brotes adventicios de cedro rojo utilizando biorreactores BioMINT® multiplicados en medio semisólido.

### 1.6. Antecedentes del cultivo *in vitro* de cedro rojo

El primer trabajo reportado de cultivo *in vitro* de *Cedrela odorata*, fue realizado por Ishii y Maruyama (1989) donde utilizando ápices, lograron obtener una gran cantidad de plántulas. En 1997 se aplicó esta herramienta para la conservación de germoplasma de *Cedrela odorata*, obteniéndose la primera semilla artificial en cedro rojo, donde los ápices de las plantas micropropagadas fueron encapsuladas (Maruyama et al., 1997).

Valverde y colaboradores (1998) obtuvieron a partir de hipocótilos, un promedio 5 brotes por explante probando el medio Woody Plant Medium (WPM) suplementado con 5.3  $\mu\text{M}$  de ANA (ácido naftalacético) y 17.7  $\mu\text{M}$  de BA (benziladenina). Mientras Andrade y colaboradores (2002), al evaluar el medio WPM con una combinación factorial de 6-BAP y 2,4-D comprobaron la capacidad morfogénica de los explantes de segmentos de raíz, cotiledón, hipocótilo y epicótilo, obtenidos a partir de plántulas provenientes de embriones

cigóticos siendo los más exitosos los explantes cotiledonares donde se obtuvo un promedio de 14 brotes.

Muñoz (2003) desarrolló una metodología de regeneración de cedro utilizando nudos, entrenudos, cotiledones y hojas para inducir embriogénesis. El medio de cultivo empleado fue MS adicionado con 20 ml L<sup>-1</sup> de endospermo líquido de coco generando una tasa de multiplicación de 4 brotes por nudo en un intervalo de 5 meses. Pérez y colaboradores (2001) utilizaron explantes de nudo cotiledonar durante la etapa de inducción con 2-iP (6-y-y-dimethylamino purina) y promover la brotación de las yemas axilares. Durante la fase de multiplicación se probaron distintos reguladores de crecimiento vegetal como bencilaminopurina, kinetina y 2-iP, donde la bencilaminopurina demostró ser la más eficiente con un promedio de 1 brote por explante.

Peña y colaboradores (2010) propusieron un protocolo de micropropagación utilizando explantes provenientes de embriones cigóticos y el uso de material revigorizado través del proceso de injertación *in vitro* y en campo. La respuesta organogénica del material injertado en patrones *in vitro* utilizando medio semisólido TY17 fue de 0.6 brotes mientras el material revigorizado se obtuvo un promedio 1.5 brotes por explante. La regeneración de brotes adventicios fue lograda usando segmentos de hipocótilos de 12 días obtenidos de plantas germinadas *in vitro*. La adición de 20 % de agua de coco al medio TY17 incremento el número de brotes por explante. El material juvenil mostró una respuesta favorable durante las etapas de elongación y enraizamiento en biorreactores BioMINT® donde hubo un incremento de 3.5 a 4 veces el tamaño de los explantes en comparación con el uso de medio semisólido.

En 2011 el grupo de García y colaboradores desarrollaron un protocolo para el establecimiento *in vitro* de brotes nodales provenientes obtenidos de esquejes juveniles en árboles ubicados en una estación experimental agroforestal. La desinfección de los explantes nodales se logró con propiconazole CE 25 al 5% durante 3 minutos con un 100% de respuesta. El desarrollo de los brotes alcanzó un 60% en un medio MS suplementado con 2 mgL<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina y 3 mgL<sup>-1</sup> de ácido naftalacético (García et al., 2011).

### 1.7. JUSTIFICACION

La problemática que actualmente enfrenta el cedro es sumamente seria, debido a la sobreexplotación de sus poblaciones naturales y la pérdida de sus características más importante desde el punto de vista económico. Actualmente las metodologías tradicionales para su propagación no son eficientes, como el uso de semillas debido a su alta variabilidad, asegurando que el material propagativo no sea de alta calidad para las plantaciones forestales comerciales.

Pero ahora con las herramientas biotecnológicas actuales, se han realizado diversos protocolos para propagación *in vitro* de esta especie, de los cuáles se han obtenido buenos resultados a través del uso de medio semisólido, pero no son del todo satisfactorios por los costos elevados de este sistema por el uso de gelificantes y mano de obra.

El uso actual de los sistemas de inmersión temporal ha permitido desarrollar protocolos en diversas especies maderables como Eucalipto o teca (Mc Alister et al., 2005; González et al, 2011). En cedro rojo se tiene desarrollado un protocolo por el grupo del Centro de Investigación Científica de Yucatán utilizando medio semisólido para la fase de inducción y multiplicación y el uso de biorreactores BioMINT® las etapas para la elongación y enraizamiento de brotes, pero actualmente aún no se han desarrollado las condiciones adecuadas para llevar a cabo el desarrollo de dicho protocolo empleando SIT durante todas las etapas de la micropropagación.

Por lo anterior en este trabajo se propone establecer las condiciones para el desarrollo de las etapas de inducción y multiplicación de brotes a partir de material de semilla en sistemas de inmersión temporal.

## **1.8. OBJETIVOS**

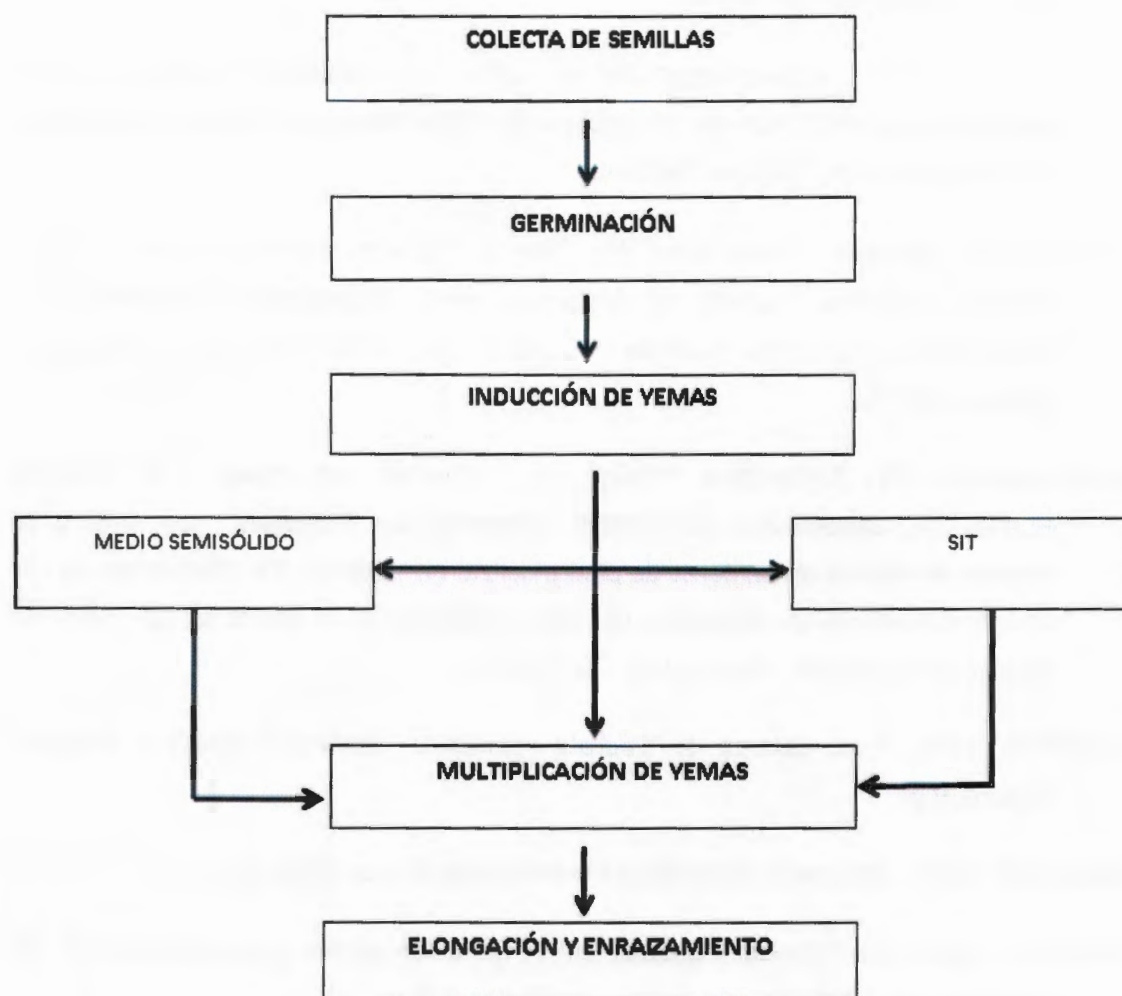
### **1.8.1. OBJETIVO GENERAL**

Establecer una metodología para el desarrollo de explantes nodales de Cedro (*Cedrela odorata* L.) mediante sistemas de inmersión temporal.

### **1.8.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Establecer el cultivo de explantes *in vitro* utilizando yemas axilares y cotiledonares de plantas provenientes de embrión cigótico en sistemas de inmersión temporal RITA®
- Determinar tiempos y frecuencias de inmersión/ aireación adecuados para las etapas de inducción y multiplicación de yemas axilares en sistemas de inmersión temporal RITA®.
- Evaluar la elongación y enraizamiento de los brotes en sistemas de inmersión temporal RITA®, así como la aclimatación de las plántulas.

## 1.9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





## 1.10. BIBLIOGRAFÍA

- Alvard, D; Côte, F; Teisson C . (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 32: 55–60.
- Andrade T. A. (2002). Micropropagación de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) como herramienta para su manejo. Programa de Agroecosistemas Tropicales. Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz.
- Badillo-Benitez, Griselda; Pulido-Salas, Ma. Teresa; Equihua- Zamora, Miguel. (2004). Árboles multiusos nativos de Veracruz para reforestación, restauración y plantaciones. Instituto de Ecología, A.C., SIGOLFO, CONAFOR. Xalapa, Veracruz, México. 288 Pp.
- Castillo-Caamal, J.B., Armendáriz -Yáñez, I.R., Caamal- Maldonado, J.A., Cervera Buenfil, A., Catzim-Cruz, C. (2008). Sistemas agroforestales para mitigar el impacto ambiental en canteras de piedra caliza, en Yucatán. En : Memorias del 1er congreso nacional de mitigación del daño ambiental en el sector agropecuario de México 2008. Celaya, Guanajuato. Pp. 329-351.
- CONAFOR. 2000. Ficha técnica de *Cedrela odorata* L., Comisión Nacional Forestal. México. 6 p.
- CONAFOR. (2001). Programa Estratégico Forestal para México 2025. 83 p
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal) 2011. Situación actual y perspectivas de las plantaciones forestales comerciales en México. 448 p.
- Cruz, C, Del Castillo, L, Robert, M. L; Ondarza, R. N . (1985) Biología y Aprovechamiento Integral del Henequén y Otros Agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC, México. 297 p.
- Cuevas, A. B. (2005). El papel de los bosques en el protocolo de Kyoto: el caso de manejo forestal de Nueva Zelanda y México
- Dominguez- Hernández, A. (2008). Desarrollo de un método de propagación masiva de

- plántulas de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) por medio de embriogénesis somática empleando biorreactores de inmersión temporal RITA®. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. Veracruz. 80 p.
- Duchefa (2001). Biochemicals Plant Cell and Tissue Culture. Duchefa Biochemie BV. Haarlem, the Netherlands. 156 p.
- Gamborg, O. L, Miller R. A, Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 148-151.
- García-González, R; Delgado, M; González Y, González, A; Garriga, M; Caligari, P; Carrasco, P; Quiroz, K. (2011). *In vitro* Propagation of Cedar (*Cedrela odorata* L.) from Juvenile Shoots. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 71(3):376-382.
- George; E.F. ; Debergh, P.C . (1984). Plant Propagation by Tissue Culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics. Eversley, Basingstoke, England. 39 p.
- George; E.F. ; Debergh, P.C . (2003). Micropropagation: Uses and Methods; in: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, George, E.F.; Hall, M.A. and G-J De Klerk (eds). Springer. Netherland. Pp .29-64.
- ITTO (2010). Tropical timber market report, Vol. 15. International Tropical Timber Organization, Yokoyama, Japan.
- Kane, E.M. (2000). Propagation from preexisting meristems, in: Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises, Second Edition, Trigiano, R. N and D.J.Gray (eds). CRC Press LLC. Pp. 75-86.
- Lamb, A.F.A. (1968). Fast growing timbers of lowland tropics. *Cedrela odorata*. Commonwealth Forestry Institute, Oxford. pp 46.
- Litz, R.E.; Jarry, R. L. (1993). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis.144-171. En: Roca W. y L. Mrogiski (Editores). Tejidos de cultivos para la agricultura. Centro Internacional de Agricultura. 953p.

- Machakova, L.; E. Zazimalova and E.F. George. (2008). Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors, in: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, George, E.F.; Hall, M.A. and G-J De Klerk (eds). Springer. Netherland. Pp .175-204.
- Martinelli, R.A.P and Aparecido, V.W. (2003). Micropropagation of Tropical Woody Species, in : Micropropagation of Woody trees and Fruits, Jain, S.M. and K. Ishii (eds.). Kluwer Academic Publisher. Pp. 153-179.
- Maruyama, E; Ishii, K; Shigenaga, K; Ohba, Saito, A. (1997). Alginate encapsulated technology for the propagation of the tropical forest trees: *Cedrela odorata*, *Guazuma crinita* and *Jacaranda momosaefolia* D: *Don silvae genetica*. 46 (1): 17-23.
- Minagri, (2005). Sistemas de inmersión temporal para el cultivo de especies vegetales de interés agrícola. Agencia de noticias del ministerio de agricultura- Chile. Disponible en [www.minagri.com](http://www.minagri.com).
- Misawa, M. 1994. Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites. FAO agricultural services bulletin, 108. 87p.
- Morel, G y C. Martin, C. (1995). Guérison de pomme de terre de maladie à virus. C.R. Acad. Sci. Paris. p 1315-1324.
- Moshkov, I.E, G.V. Novikova, M.A. Hall and E.F. George (2008). Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscissic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds, in: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, George, E.F.; Hall, M.A. and G-J De Klerk (eds). Springer. Netherland. pp.227-282.
- Mulet- Hing, M., de la Cruz- Licea, G., Otero González M., González Suárez, A., Brito Delgado, L., Marañón Cardonne M. (1999). Sistema de inmersión temporal automatizado. *Tecnología Química*, Vol 19, No. 1.
- Muñoz, S. CIRGEBV. (2003). Embriogénesis somática en cedro (*Cedrela odorata* L) a partir de cotiledones. Tesis para optar por el título de Licenciado en Biología.



- 
- Murashige, T; Skoog, F. (1962). A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Physiología plantarum* 15: 53-58.
- Negreros, C. (1997). Evaluación del sostentabilidad del manejo forestal de la organización de ejidos forestales productores de la Zona Maya Quintana Roo. Reporte a la Fundación Rockefeller. Ciudad de México. 64 p.
- Patiño-Valera, F. (1997). Recursos genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los neotrópicos: Propuestas para acciones coordinadas. Dirección de recursos forestales. Departamento de Montes. FAO. Roma, Italia.p.7.
- Pennington , T. D y J. Sarukán. (2005). Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. 3ª edición. México, D.F. 523 pp.
- Peña-Ramírez, Y., Juárez- Gómez, J., Gómez-López, L., Jerónimo-Pérez, J., García-Sheseña, I., Gónzalez-Rodríguez, J, Rober, M.L. (2010). Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L) cultured in vitro using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for highly valuable tropical tree species. *In vitro Cell. Dev. Biol- Plant*, 46(149-160).
- Pérez, F. J. (2001). Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 81 pp
- Pérez, J; Alvarado, Y; Gómez, R; Jiménez, E; Orellana, P. 1998. Propagación y mejoramiento genético de las plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. CU. p 57-79.
- Preece, J.; Read, P. (2005). The biology of horticulture –An introductory textbook. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc. United States of America. Pp. 488.
- Preil, W. (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. pp. 588.
- Quijano, T. (2011). Manejo de la sombra sobre el crecimiento de *Cedrela odorata* L. y la
-

- incidencia de *Hypsipyla grandella* y *Chrysobothris yucatanensis*. Tesis de Licenciatura. Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Autónoma de Yucatán. 74 p.
- Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. (2005). Biology of plants. 7<sup>th</sup> ed. W. H. Freeman and Company. United States of America.
- Rodríguez, R., Daquinta, M., Capote, I., Pina, D., Y. Lezcano y J.L. González-Olmedo (2003). Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahogani* (caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (Cedro). Cultivos tropicales, 24(3), 23-27.
- Robert M.L., Herrera-Herrera, J., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M., y Fuentes-Carrillo, P. (2006 a). A new temporary bioreactor immersion system for micropropagation in plant cell culture protocols. Loyola, y Vazquez Flota Eds. Humana Press, New York . pp.399.
- Robert M.L., Herrera-Herrera, J., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M., y Fuentes-Carrillo, P. (2006 b). A new temporary bioreactor immersion system for micropropagation in plant cell culture protocols. Loyola, y Vazquez Flota Eds. Humana Press. Pp. 121-399.
- Rodriguez- Lara, R. (1990). Plagas forestales y su control en México. 2<sup>a</sup> edición. Universidad Autonoma de Chapingo. México. Pp. 111-115.
- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2002). Programa Nacional Forestal 2001-2006.
- Smith, R.H. (2000). Plant Tissue Culture: techniques and experiments. 2da. Ed. Academic Press London. 230 p.
- Simula, M., Siquiera, G., V. Sosa-Cedillo y T. Synnott (2005). Achieving the ITTO Objective 2000 and sustainable forest management in México. International Tropical Timber Organization. Pp.168

- Teisson, C., Alvard, D. (1995). In vitro production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato research*. 42: 499-504.
- Trigiano, N; Gray, D. (2000). *Plant Tissue Culture Concept and Laboratory Exercises*. 2da edición. Library of Congress Cataloging in Publication Data. Pp. 453.
- Valverde C. L.; Dufour, M.; Villalobos, V. (1998). In vitro organogénesis in *Albizia guachapele*, *Cedrela odorata* and *Swietenia macrophylla* ( Fabaceae; Meliaceae. *Revista de Biología Tropical*. 46 (2): 225-228.
- Van Staden, E. Zazimalova and E.F. George. (2008). Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists, in: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, George, E.F.; Hall, M.A. and G-J De Klerk (eds). Springer. Netherland. pp. 205-226.
- Winthers, L. (1985). Cryopreservation and storage of germoplasm. En: *Plants cell culture: a practical approach*, R.A. Dixon (ed). IRL Press, Oxford. p 169-191.
- Zobel, B.J. and Talbert, J. (1984). *Applied Forest tree Improvement*. John Wiley and Sons, New York. NY. Pp. 505.



---

## **CAPÍTULO II. SELECCIÓN DE ARBOLES PLUS PARA LA OBTENCIÓN DE SEMILLAS, COLECTA DE SEMILLAS Y GERMINACIÓN *IN VITRO***

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

La identificación y selección de un árbol con alto rendimiento, es el inicio y la base fundamental de un programa de mejoramiento genético forestal (Vallejos *et al*, 2010). El mejoramiento del germoplasma forestal consiste en la conservación de árboles y áreas forestales para asegurar una base genética amplia y el establecimiento de ensayos genéticos que permitan seleccionar los mejores genotipos (Wightman *et al.*, 2007).

En condiciones naturales es poco probable que al seleccionar un árbol se tenga la certeza de su superioridad genética en crecimiento o alta producción de volumen, por lo cual se recurre al uso de árboles plus para la obtención de semillas (Zobel y Talbert, 1988). Esta opción consiste en seleccionar y marcar fenotipos sobresalientes, ya sea en plantaciones o en el bosque natural, y coleccionar su semilla para el establecimiento de plantaciones. A menudo, se piensa que cualquier árbol que abastezca de semillas puede ser considerado como árbol plus, sin embargo, éste debe cumplir ciertas características fenotípicas. Estas características son individuos altos, tronco lo más recto posible, libre de bifurcaciones y estado fitosanitario bueno que son elegidos debido a su alta heredabilidad (Vallejos *et al*, 2007).

Es importante llevar a cabo un proceso de selección y manejo de árboles plus para la obtención de semillas, porque permite tener una fuente permanente de producción con un origen conocido, el cual garantiza en gran medida que las buenas características de los progenitores seleccionados sean transmitidas a sus descendientes, el cual representa una alternativa económica de producir semilla de mejor calidad a muy corto plazo para la comercialización y establecimiento de plantaciones forestales y es el punto de partida para todo tipo de programa de mejoramiento genético forestal orientado al establecimiento de huertos semilleros y conservación del germoplasma (Vallejo *et al*, 2007; Mesén, 1995).

Una vez seleccionado los árboles plus se deben tener en cuenta diversos factores para la recolección y la cosecha de las semillas. En la recolección se debe tener en cuenta la



época de producción de frutos, las características del fruto, del sitio, el volumen de semillas y el equipo disponible para la cosecha (CATIE *et al*, 1997). Peña *et al*, 2010 reporta la época para la recolección de frutos de cedro rojo entre los meses de febrero y mayo, mientras el almacenamiento de los frutos se debe realizarse a una temperatura de 25°C y una humedad relativa de 10% en una bolsa plástica negra junto con fungicidas para evitar la contaminación y pérdida de los frutos.

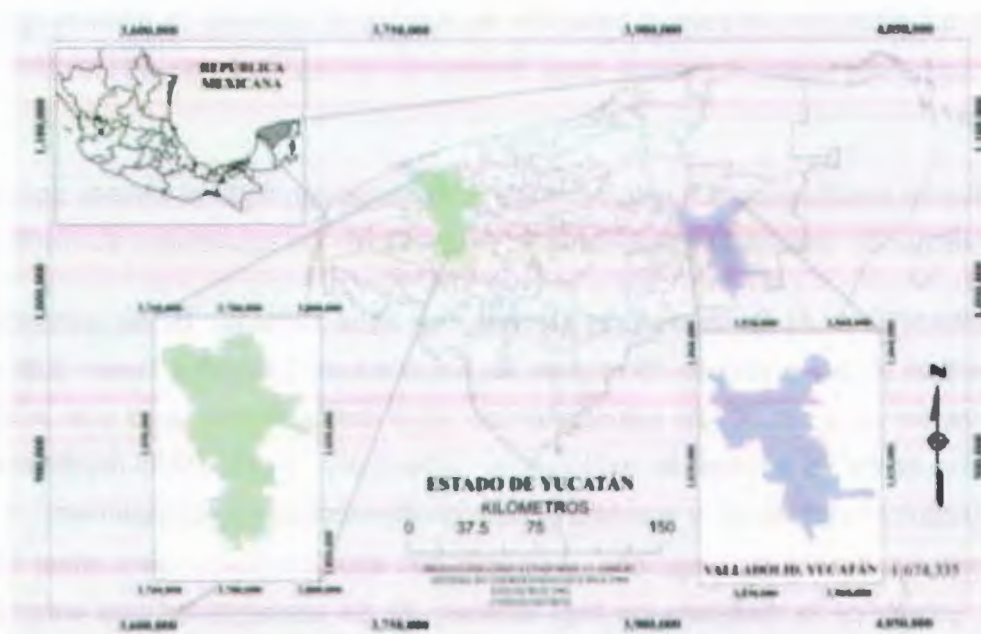
Para la germinación *in vitro* de semillas de cedro rojo se utiliza el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) a un pH 5.7, con una temperatura de anaquel de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , intensidad de lumínica  $70 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad, humedad relativa de 40% ( Juárez, 2008).

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. Selección de los árboles de cedro rojo para la obtención de semillas

La selección y el muestreo de los árboles para la recolección de semillas se llevaron a cabo en domicilios particulares en el municipio de Mérida y Valladolid (Figura 4). Esta selección se llevó en dichos lugares, ya que fue muy difícil encontrar en áreas naturales los árboles que cumplieran con las características fenotípicas deseadas, por lo cual es más común encontrar dentro de predios particulares la disponibilidad de diversos individuos.

Los caracteres fenotípicos que se tomaron en cuenta para la elección de los árboles semilleros fueron la altura, fuste recto y libre de enfermedades. Se realizó una colecta anual en cada sitio durante el mes de marzo, durante el 2012 y 2013 en un individuo de cada lugar seleccionado. Con ayuda de una tijera se procedió al corte de las ramas y la recolecta de los frutos, los cuáles fueron colocados dentro de una caja para su transporte hacia los invernaderos del Centro de Investigación Científica de Yucatán.



**Figura 4.** Ubicación de las áreas de muestreo en los municipios de Mérida y Valladolid (Base megadatos INEGI, 2003)

Los frutos fueron colocados en una malla donde fueron expuestos diariamente al sol durante 4 horas hasta que espontáneamente se abrieran para la obtención de las semillas. Estas semillas fueron resguardadas en una caja de unicel con antifúngicos antrak (Metil-(butilcarbamoil) benzimidazol-2-il carbamato y manzate (Etilem-bisditocarbamato de manganeso).

### **2.2.2. Axenificación y germinación de semillas en medio semisólido y en biorreactores BIOMINT®**

Las semillas colectadas, fueron tratadas previamente con un proceso de axenificación siguiendo la metodología establecida por Juárez (2008). Para ello se retiró el ala de las semillas para disminuir el área de exposición a la contaminación como se muestra en la Figura 5 A; posteriormente se sumergieron por 12 horas en soluciones de antifúngicas comerciales tales como antrak (Metil-(butilcarbamoil) benzimidazol-2-il carbamato y manzate (Etilem-bisditocarbamato de manganeso) utilizando 1 gramo por litro de cada antifúngico (Figura 5 B). Posteriormente se lavaron las semillas con agua destilada hasta retirar totalmente los residuos del fungicida. Luego las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 30% (6% de cloro libre) durante 20 minutos agitando aproximadamente cada 2 minutos para finalmente enjuagarlas tres veces con agua destilada.

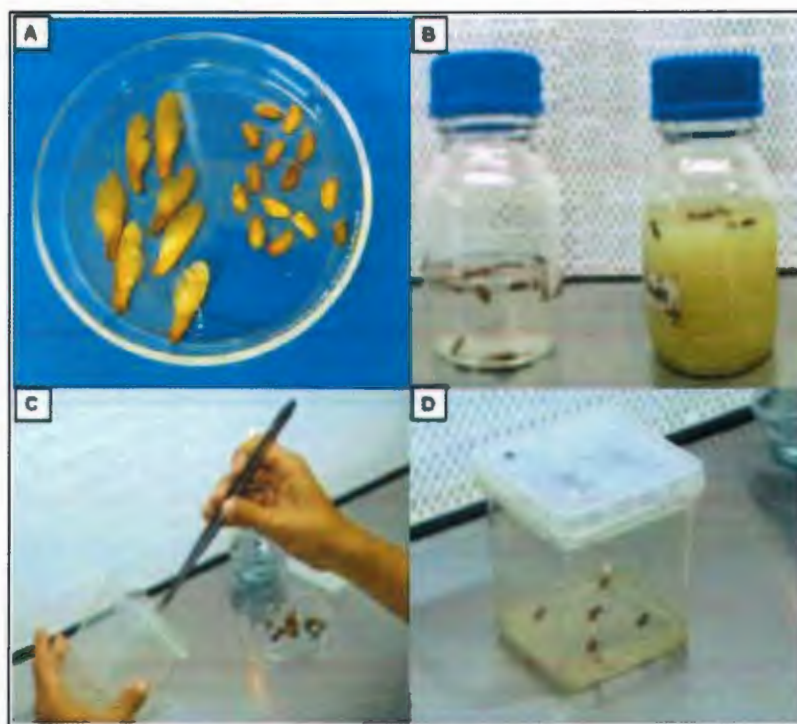
Se realizaron modificaciones a este protocolo de desinfección dado el elevado porcentaje de contaminación observado en las semillas. Se evaluaron los siguientes tratamientos:

**TRATAMIENTO 1.** A) Se lavaron las semillas con agua corriente, B) Se colocaron las semillas bajo agitación durante 30 minutos en solución con Extran® y Tween 80® a una concentración de 5 m/L, C) Se enjuagaron con agua destilada tres veces y se sumergió por 12 horas en soluciones de antifúngicos comerciales, antrak (Metil-(butilcarbamoil) benzimidazol-2-il carbamato y manzate (Etilem-bisditocarbamato de manganeso) (1 g/L), D) Se retiró la mezcla de fungicidas y se lavó con agua destilada hasta retirar todo el residuo dentro de la campana de flujo laminar, E) Se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio (12% de cloro libre) durante 30 minutos agitando aproximadamente cada dos minutos, F) Se enjuagaron con agua destilada estéril hasta retirar todo residuo.

**TRATAMIENTO 2.** A) Se lavaron las semillas con agua corriente, C) Las semillas se



sumergieron por 12 horas en soluciones de antifúngicos comerciales, antrak (Metil-(butilcarbamoil) benzimidazol-2-il carbamato y manzate (Etilem-bisditocarbamato de manganeso) (1 g/L), D) Se retiró la mezcla de fungicidas después de haber transcurrido el tiempo y se lavó con agua destilada hasta retirar por completo el residuo de fungicida, E) Se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio (12% de cloro libre) durante 30 minutos en agitación constante, F) Se enjuagaron con agua destilada estéril hasta retirar todo residuo.



**Figura 5.** A) Semillas; B) Axenificación con antifúngicos y con cloro; C) Sembrado de las semillas en medio semisólido; D) Magenta con semillas

Posteriormente las semillas fueron colocadas en medio semisólido preparado de la siguiente manera (4.3 g/L), sacarosa (30 g/L), VI vitaminas (10mL/L), phytigel (1.75 g/L), agar (1.75 g/L) (Figura 6 C). Para su germinación las condiciones fueron siguientes: la temperatura  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , intensidad lumínica  $70 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$  luz blanca de lámparas tubulares fluorescentes con fotoperiodo de 16 horas de luz por 8 horas de oscuridad, con humedad relativa de 40% (Figura 5 D).

Para la contaminación se utilizó un diseño completo aleatorio con arreglo factorial de 8 repeticiones. Cada repetición estuvo compuesta por una caja magenta con 5 semillas cada uno. También se probó la germinación de semillas en biorreactores BioMINT®. Se pusieron 25 semillas por biorreactor con 4 repeticiones con una inmersión de 2 minutos cada 4 horas. Se evaluaron durante 6 semanas seguidas para obtener el porcentaje de germinación comparándolo con el sistema de medio semisólido.

### **2.2.3. Análisis estadístico**

Para todos los experimentos, los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de una sola vía para la comparación de medias y en algunos casos se aplicó la prueba de comparaciones múltiples (LSD) de Fisher. Los datos fueron analizados con el programa estadístico Statistica 5.0.



## 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1. Selección de los árboles de cedro rojo para la obtención de semillas

La ubicación de los árboles que cumplieran las características descritas anteriormente fue complicada, ya que en los recorridos realizados fue difícil ubicar a los individuos candidatos para la obtención de semilla. Esto puede deberse a diversas problemáticas que enfrenta esta especie como el aprovechamiento selectivo sobre individuos destacados (Cavers *et al*, 2004), el ataque de diversas plagas como el barrenador, ya que fue común encontrar muchos árboles con bifurcaciones por lo que dificultó la ubicación de los árboles.

En el cuadro 1, se muestran los parámetros morfológicos de cada uno de los árboles seleccionados:

**Cuadro 1.** Características morfológicas de los individuos muestreados

<b>Parámetros morfológicos</b>	<b>Árbol (Mérida)</b>	<b>Árbol (Valladolid)</b>
Altura (metros)	9 m	10 m
Diámetro a la altura del pecho (DAP) (metros)	1 m	1 m
Edad (años)	20	15

En cada colecta realizada entre 2012 y 2013 en cada uno de los sitios se obtuvo un estimado de 1000 frutos, haciendo un total de unos 2000 frutos. En la figura 6A se observa el árbol del sitio en Valladolid y en la figura 6B los frutos recién colectados. Posteriormente los frutos fueron transportados al Centro de Investigación Científica de Yucatán y se secaron al sol sobre una malla (Figura 6C) hasta que ocurriera su apertura y las semillas fueron depositadas en una caja de unicel con antifúngicos (descritos en metodología) y resguardados en un lugar libre de humedad para su posterior germinación.



**Figura 6.** A) Árbol élite seleccionado; B) Frutos colectados en Valladolid, Yuc; C) Secado de los frutos

### **2.3.2. Axenificación y germinación de semillas en medio semisólido y en biorreactores BIOMINT®**

Del protocolo reportado por Juárez, 2008 para la desinfección de semillas se realizaron algunas modificaciones, ya que se presentó una elevada tasa de contaminación. Los resultados de los tratamientos empleados se muestran en el cuadro 2 donde se observa que el tratamiento 1 obtuvo un porcentaje de contaminación de un 22% mientras el tratamiento 2 fue del 32% de contaminación. El ANOVA indicó que no existe diferencia significativa en ninguna de las dos metodologías aplicadas. Comparando nuestros resultados con los de Juárez (2008) el cual obtuvo una contaminación del 5% exponiendo a las semillas en hipoclorito de sodio durante 20 minutos. Estas diferencias observadas se pueden deber a diversas causas como la manipulación y almacenamiento de semillas y otra destacada es el origen del material, ya que utilizo procedía del municipio de Acayucan, Veracruz donde las condiciones climáticas son diferentes a las de Yucatán, por lo que se puede suponer que el contenido de microorganismos pudo variar y hubo diferencia en la contaminación. En un estudio realizado en la especie *Cedrela*



*salvadorensis* Standl, encontraron diferencias en la contaminación de semillas germinadas *in vitro* provenientes de diversos árboles (Soto et al, 2010), demostrando que la procedencia del material influye en el comportamiento y desarrollo de la planta, por lo que se debe adaptar un método de desinfección diferente en cada caso.

**Cuadro 2.** Porcentaje de contaminación y germinación en los tratamientos de axenificación evaluados

Método de desinfección	Porcentaje de contaminación	Porcentaje de germinación
1	22 <sup>a</sup>	82 <sup>a</sup>
2	32 <sup>a</sup>	64 <sup>b</sup>

Nota: Las letras simbolizan las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ )

En el cuadro 3 se observa el porcentaje de contaminación y germinación de las semillas en medio semisólido y en medio líquido. En medio semisólido el porcentaje de contaminación fue de un 12% y en medio líquido fue de un 100%, encontrándose una diferencia significativa entre ambos tratamientos. La contaminación microbiana en algunas semillas es difícil de tratar, ya que poseen una testa que protege al embrión, lo que no permite que los agentes antimicrobianos eliminen por completo la contaminación (Cassel, 2001). Uno de los principales problemas, es que la contaminación microbiana del medio de cultivo líquido se dispersa a todas las plantas en vez de formar colonias localizadas tal como ocurre en el medio semisólido (Robert et al, 2006a),

En cuanto a la germinación ambos presentaron un 78%, demostrando que la contaminación no afectó el desarrollo de las plántulas, por lo cual es una opción el uso del medio líquido para el desarrollo de las semillas solamente tratando de buscar nuevas opciones para controlar la contaminación en este tipo de medio. Para esta especie Juárez (2008) reporta una germinación entre el 60 y 99% de germinación, destacando una relación entre el tiempo de exposición al hipoclorito de sodio y porcentaje de germinación.

**Cuadro 3.** Porcentaje de germinación y contaminación de semillas en medio semisólido y medio líquido.

Tipo de medio	Porcentaje de contaminación	Porcentaje de germinación
Semisólido	12 <sup>a</sup>	78% <sup>a</sup>
Líquido	100 <sup>b</sup>	78% <sup>a</sup>

Nota: Las letras simbolizan las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ )

## **2.4. CONCLUSIONES**

-Mediante observación fueron seleccionados 2 árboles con características destacadas para la colecta de frutos.

-El tratamiento 1 de axenificación de semillas fue el que presentó el menor porcentaje de contaminación con un 22% y una germinación del 82%, mientras el tratamiento 2 con un 32% de contaminación y una germinación del 64%.

-El uso del medio semisólido es el más adecuado para controlar la contaminación microbiana ya que la pérdida de explantes fue muy baja en comparación con el medio líquido puede llegar a ser de un 100%.



## 2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Cassel, A. C. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37 (2), 133-138.
- Cavers, S., C. Lowe y A.J. Lowe (2004). Targeting genetic resource conservation in widespread species: a case of *Cedrela odorata* L. *For. Ecology Management*, 197, 285-294.
- Juárez, J. (2008). Desarrollo de un protocolo para la micropropagación de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) empleando biorreactores de inmersión temporal BioMINT®. Tesis Ingeniería. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. 60 p.
- Mesen, F (1995). Justificación económica del mejoramiento genético forestal, en *Memorias: Primer seminario nacional sobre mejoramiento genético y semillas forestales*. Santo Domingo, Rep. Dominicana. Pp. 1-9.
- Peña-Ramírez, Y., Juárez- Gómez, J., Gómez-López, L., Jerónimo-Pérez, J., García-Sheseña, I., González-Rodríguez, J, Rober, M.L. (2010). Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L) cultured in vitro using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for highly valuable tropical tree species. *In vitro Cell. Dev. Biol- Plant*. Publicación on line.
- Robert M.L., Herrera-Herrera, J., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M., y Fuentes-Carrillo, P. (2006 a). A new temporary bioreactor immersion system for micropropagation in plant cell culture protocols. Loyola, y Vazquez Flota Eds. Humana Press. pp.399.
- Soto, B., Valverde, L., A, Rojas y A. Hine ( 2010). Establecimiento *in vitro* de *Cedrela salvadorensis* Standl. *Tecnología en Marcha*, 23 (4): . 66-73 p
- Vallejos, J.( 2007). Contribuciones al programa de mejoramiento genético de BARCA S.A. Informe de Práctica de Especialidad. Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 66 pp
- Wightman, K; Rodriguez, B; Wards, S; Cornelius, J. (2007). Domesticación de cedro y

caoba en la península de Yucatán, México. Experiencias en el mejoramiento del germoplasma forestal. Recursos Naturales y Ambiente. 44: 119-128.

Zobel, B y J.T Talbert (1988). Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Editorial Limusa, México. Pp. 199-244.



---

## CAPÍTULO III. ESTABLECIMIENTO DE TIEMPOS DE Y FRECUENCIAS DE INMERSIÓN/AIREACIÓN ADECUADOS PARA LA INDUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE EXPLANTES NODALES EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL RITA®

### 3.1. INTRODUCCIÓN

La integración de un sistema de inmersión temporal para la propagación y establecimiento de un proceso de cultivo *in vitro* incluye la selección de la planta donante, el establecimiento del cultivo aséptico y la multiplicación de los explantes. Estos sistemas pueden ser usados para la producción de brotes, los cuáles pueden ser enraizados en el mismo sistema. Habilita el cambio de medios de cultivo con más facilidad. El sistema de inmersión temporal presenta diversas ventajas sobre el uso de medio semisólido y medio líquido estático, destacando el cambio de medio de cultivo con más facilidad, siendo la opción más atractiva desde el punto de vista comercial ya que se requiere menos mano de obra, manipulación y transferencia de plantas (Robert *et al*, 2006a; Jiménez *et al.*, 1999).

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) proporcionan un sistema aeróbico eficiente para el crecimiento de las plantas, a través de la ventilación forzada o el cambio pasivo de la atmósfera interior en el envase. Sin embargo, los tiempos de inmersión así como la duración y la frecuencia, son los parámetros más críticos para la eficiencia del sistema (Alvard *et al.*, 1993; Berthouly y Ettiene, 2005). Los tiempos y frecuencias de inmersión empleados varían de acuerdo a la especie, proceso de micropropagación o del tipo de sistema de inmersión temporal usado. Muchos investigadores han encontrado que el tiempo de inmersión afecta el rango de crecimiento de la planta, ya que influye en la disponibilidad de los nutrientes y la composición interna dentro del contenedor de cultivo (Jiménez *et al.*, 1999; McCallister *et al.*, 2005).

La elongación y enraizamiento son etapas decisivas para la sobrevivencia *ex vitro* de las plantas derivadas de la multiplicación, ya que son pequeñas y no son capaces de soportar la aclimatación en el exterior (Aitken-Christie *et al*, 1995). Se ha encontrado que los sistemas de inmersión temporal son adecuados para la inducción y la multiplicación como para la aclimatación de las plantas. (Aitken-Christie *et al.*, 1995; George y Debergh, 2003).

Se ha reportado el enraizamiento exitoso de diversas especies en sistemas de inmersión temporal RITA® como *Hevea brasiliensis* (Etienne et al, 1997); *Eucalyptus sp.* (McAlister et al, 2005).



### 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.1. Establecimiento de los tiempos de inmersión/aireación para la inducción de yemas en sistemas de inmersión temporal RITA®

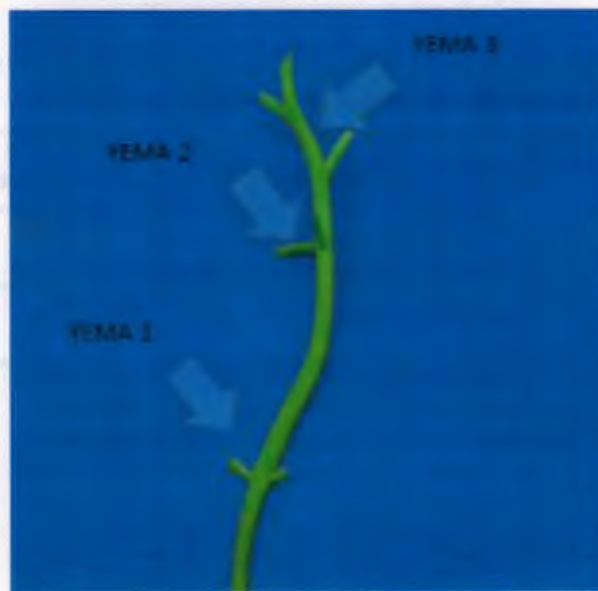
El establecimiento de los tiempos y frecuencias de inmersión/aireación para llevar a cabo la inducción de yemas es de vital importancia, por lo que se procedió a realizar una prueba preliminar para establecer el tiempo y la frecuencia adecuada para dicha etapa, debido que hasta ahora no se tiene reportado la inducción de cedro rojo en sistemas de inmersión temporal. Se utilizaron plantas germinadas *in vitro* de 2 meses de edad con el objetivo de inducir la proliferación de las yemas. En cada recipiente RITA® se pusieron 20 explantes utilizando todo tipo de yemas de un tamaño de 1 cm aproximadamente con 12 repeticiones por cada tratamiento (frecuencias), en este caso la frecuencia de 3 horas fue el tratamiento 1 y de 6 horas el tratamiento 2, ambas con una inmersión de 2 minutos (cuadro 4). Se comparó la influencia del medio sobre el desarrollo de las plantas, así como el uso del regulador vegetal de crecimiento Dicamba.

**Cuadro 4.** Tiempo y frecuencia de inmersión para la inducción de yemas en sistemas RITA®.

Tratamiento	Tiempo (min)	Frecuencia (horas)
1	2	3
2	2	6

### 3.2.2. Selección de explantes para la inducción de yemas axilares y cotiledonares en sistemas de inmersión temporal RITA®

La micropropagación del cedro se realizó a partir de plántulas provenientes de semillas germinadas *in vitro*, las cuáles no se separaron por sitio de colecta. Durante la selección del explante, se utilizaron plántulas que tuvieran 3 nodos y se evaluaron tres diferentes tipos de yemas de acuerdo a su posición en la planta (figura 7). El medio de inducción básico estaba compuesto por medio MS y carbón activado, al cual se le adiciono Dicamba a una concentración de  $13.54\mu\text{m}$ . Los explantes fueron puestos en recipientes RITA® y el cultivo en medio semisólido en cajas magenta. En el caso de los contenedores RITA® se emplearon tres repeticiones de cada una de las yemas conteniendo 20 explantes cada uno sometidas a diferentes frecuencias de inmersión como se puede observar en el cuadro 5, mientras en cajas magentas se cultivaron 5 explantes en cada una con 8 repeticiones. Se evaluó el porcentaje de respuesta de cada una de las yemas a las 6 semanas.



**Figura 7.** Plántula germinada *in vitro* de 3 meses. Las flechas nos indican la posición de las yemas en la planta (Segura, 2012)

**Cuadro 5.** Frecuencias de inmersión empleadas en la inducción y multiplicación de tres yemas en sistemas RITA®

YEMA	TIEMPO DE INMERSIÓN (MINUTOS)	FRECUENCIAS (HORAS)
1	1	4, 8 Y 12
2	1	4, 8 Y 12
3	1	4, 8 Y 12

### 3.2.3. Multiplicación de yemas preexistentes en sistemas de inmersión temporal RITA®

En la etapa de multiplicación se emplearon yemas provenientes de la inducción, se consideraron brotes que tuvieran un tamaño mayor a 0.5 cm. Se depositaron 20 explantes en cada biorreactor RITA® respetando el tipo de yema como se describe anteriormente (cuadro 4). Se realizaron 3 repeticiones de cada una de las yemas y fueron sometidas a diferentes frecuencias de inmersión. Bajo las mismas condiciones se empleó medio semisólido como cultivo testigo. En esta etapa se utilizó un medio MS libre de reguladores de crecimiento vegetal, debido a la respuesta favorable de los explantes en la etapa de inducción.

A las 6 semanas se realizó el conteo en cada una de las repeticiones, se contabilizaron uno a uno los brotes y se sacó un promedio de cada una de las yemas

Durante esta etapa, los brotes presentaron una adecuada elongación y debido al poco espacio que presentan los biorreactores RITA® para su desarrollo, se decidió retirarlos y se midieron una a una todas las yemas con una regla y se calculó el tamaño promedio de cada una de las yemas ontogénicamente. Se observó durante las mediciones el desarrollo de raíces en algunas de las plántulas ya elongadas, por lo que se midió cada



una de las raíces presentes con una regla (Figura 8), en este caso solo se tomaron en cuenta las que presentaron un tamaño mayor a 0.5 cm. Posteriormente estas plantas se sembraron en una bandeja con peat moss y agrolita (1:1) y se le colocó una bolsa de plástico transparente que permitiera el paso de la luz y conservara la humedad. Se evaluó el porcentaje de aclimatación en base a la posición de las yemas en la planta.



**Figura 8.** Medición de raíces de explantes provenientes de sistemas RITA®

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1. Establecimiento de los tiempos de inmersión/aireación para la inducción de brotes en sistemas de inmersión temporal RITA®

Al no haber reportes del uso de biorreactores RITA® en la etapa de inducción de cedro rojo, se procedió a probar dos frecuencias bajo las condiciones descritas en el apartado de metodología. A las 4 semanas en sistema RITA® con la adición del regulador de crecimiento Dicamba el mayor porcentaje de inducción fue a la frecuencia de 6 horas con un 85% , como se muestra en el cuadro 6, presentando un resultado similar al reportado por Juárez en el 2008, donde obtuvo un 80% de proliferación de yemas a los 30 días. Para los tratamientos donde no se adiciono ningún regulador de crecimiento, el porcentaje de respuesta fue de un 100% para las dos frecuencias de inmersión (3 y 6 horas) y el medio testigo. A las 6 semanas, el tratamiento testigo y la frecuencia de 3 horas con Dicamba no presentaron ningún aumento en el porcentaje de respuesta, mientras la frecuencia de 6 horas tuvo un ligero aumento con un 95% de proliferación. En la figura 9 incisos A y B se puede observar el desarrollo de las yemas en la frecuencia de 3 horas, donde presentaron problemas de hiperhidricidad y los incisos C y D a una frecuencia de 6 horas donde las hojas presentaron un mejor desarrollo.

Los explantes desarrollados en los biorreactores presentaron problemas de hiperhidricidad, debido a que una de las principales desventajas del cultivo en este sistema es el alto grado de hiperhidratación y la oxidación de los tejidos, aspectos que han sido asociados con factores como el tiempo y la frecuencia de inmersión (Etienne y Berthouly, 2002; Castro y González, 2002). González y colaboradores (2011) observó en *Eucalyptus grandis* la hiperhidratación de los tejidos principalmente a nivel del mesófilo y haz vascular foliar. En caso del tratamiento testigo (semisólido) adicionado con Dicamba presento un bajo porcentaje de respuesta resultados que no coinciden con lo reportado por Juárez (2008) donde obtuvo hasta un 80% de proliferación de yemas. Estos resultados obtenidos pueden ser por diversas causas como la procedencia del material inicial, ya que fueron de distintos lugares y la morfogénesis puede estar fueron de diferentes lugares, ya que se menciona que la morfogénesis puede estar influenciada por el genotipo (Pierik,



1997) así como el medio de cultivo utilizado, pudieron ser algunos de los factores que afectaron el desarrollo del explante.



**Figura 9.** Inducción de yemas en sistemas RITA®. A y B) Frecuencias de 3 horas y C y D) Frecuencias de 6 horas.

En el tiempo de inmersión con 2 minutos al obtenerse brotes hiperhidratados ( Cuadro 7) se decidió disminuir el tiempo y ampliar las frecuencias en este caso fueron de 4, 8 y 12 horas, probando igualmente el medio líquido con regulador de crecimiento Dicamba y medio líquido sin regulador de crecimiento. En el cuadro 7 se reportó la influencia de la localización del explante en plantas juveniles, pero también se observó el porcentaje de respuesta en las frecuencias de inmersión, en el caso de la frecuencia de 4 horas el nodo 2 presento alto porcentaje de un 95%, en el caso del medio líquido sin ningún regulador y el nodo 3 presento el porcentaje más alto con un 65%. Para la frecuencia de 8 horas con medio sin regulador los nodos 1 y 2 obtuvieron un 100% de brotación y en el caso del nodo 3 con medio líquido con regulador presento un 95% mientras en la frecuencia de 12

horas en todos los nodos se presentó una respuesta del 100%, en todos los tratamientos excepto en el nodo 1 donde fue de un 85% de respuesta. La buena respuesta en los sistemas RITA® puede ser debido a la capacidad proliferativa del material joven y el contenido de reguladores de crecimiento endógeno, como menciona Orea y Villalobos (1985) donde el carácter juvenil de los materiales a introducir *in vitro* es muy importante para el desarrollo de los explantes, cuáles son fisiológicamente más sensibles al cultivo *in vitro* que un material adulto. La favorable respuesta de los nodos en el sistema RITA® en comparación con el medio semisólido puede ser debido efecto de que los explantes se encuentran en contacto con el medio líquido, esto puede estimular y facilitar la toma de nutrientes y también de fitohormonas produciendo mejores brotes (Ziv, 1995 b; Smith y Spomer, 1995). La desaparición o la menor expresión de la actividad de dominancia apical en el cultivo de nodos se pueden atribuir a los constantes movimientos de los tejidos en el medio, la cual es otra importante característica del medio líquido, lo cual generalmente permite la inducción y la proliferación de numerosos brotes axilares.

**Cuadro 6.** Porcentaje de la respuesta de inducción en sistemas RITA® a las 4 y 6 semanas.

Sistema de micropropagación	% inducción a las 4 semanas		% de inducción a las 6 semanas	
	Dicamba	S/dicamba	dicamba	S/dicamba
Semisólido (Testigo)	33	100	33	100
RITA® (2 min/3 horas)	75	100	75	100
RITA® (2 min/6 horas)	85	100	95	100

**Cuadro 7.** Porcentaje de hiperhidratación de brotes según la frecuencia de inmersión en sistemas RITA a las 4 y 6 semanas

Sistema de micropropagación	4 semanas % de hiperhidricidad		6 semanas % de hiperhidricidad	
	C/R	S/R	C/R	S/R
Semisólido	10	10	10	10
RITA (Frecuencia 3 horas)	56	45	62	52
RITA (Frecuencia 6 horas)	48	42	53	47



### 3.3.2. Selección de explantes para la inducción de yemas axilares y cotiledonares en sistemas de inmersión temporal RITA®

La influencia del origen del explante es uno de los principales factores de estudio para la micropropagación de las especies vegetales, porque de ella depende el potencial que un explante pueda presentar para su multiplicación *in vitro*. Para la micropropagación de cedro a partir de plántulas germinadas *in vitro* se comparó el desarrollo de yemas diferentes ontogénicamente, la influencia del regulador dicamba y las frecuencias de inmersión sobre el porcentaje de respuesta.

En el cuadro 8 se observa la frecuencia de 4 horas, la yema 2 es la que presento la tasa de respuesta más alta con un 95% sin la presencia de ningún regulador crecimiento, mientras tanto la yema 1 con la presencia de Dicamba presento solamente un 25% de proliferación. La yema 1 y 2 a una frecuencia de 8 horas sin regulador de crecimiento presentaron un porcentaje de respuesta del 100% y la que presento la menor respuesta fue la yema 1 con regulador dicamba con un 70%. Los resultados fueron bastante favorables para todas las yemas tanto con el medio que contenía dicamba y sin dicamba con un 100% excepto en la yema 1 que presento un 85%. En la figura 10 A y B se puede observar un buen desarrollo de la yema 1 o nodal a las 6 semanas y con la presencia de dicamba en el medio (10 C y D) no hubo un crecimiento adecuado de las hojas mientras en la base de los explantes se presentó la formación de callos. En este caso podemos decir que los sistemas de inmersión temporal son favorables para esta fase de inducción de cedro rojo, ya que se obtuvieron buenos resultados y son una alternativa al uso del medio semisólido, bien porque no necesitan el uso de gelificantes ni el uso de una gran cantidad de mano de obra para la propagación masiva de esta especie (Robert *et al*, 2006 a). La posición de la yema en la planta es un factor importante para la obtención de un buen explante. En el cuadro 9 se puede observar el número promedio de brotes por explante en ambos sistemas utilizados. El número promedio de yemas preexistentes dentro de las explantes desarrollados en medio semisólido presento un comportamiento obteniéndose un máximo de 1.8 brotes por explante en un período de 6 semanas de cultivo.

Comparando el uso del regulador de crecimiento dicamba en el medio y la influencia del

biorreactor RITA , la frecuencia cada 4 horas presentó en la yema 3 el promedio más alto de 3.1 brotes ( Figura 11 C) seguido por la yema 2 (Figura 11 B) y 1.8 para la yema 1 (Figura 11 A) en un medio sin regulador. A esta misma frecuencia de 4 horas con el uso del regulador de crecimiento la yema 1 presento el mayor promedio con 2 brotes con explantes.

**Cuadro 8.** Porcentajes de brotación a las 6 semanas en los diferentes tipos de yemas, frecuencias de inmersión y dicamba (13.57  $\mu$ M)

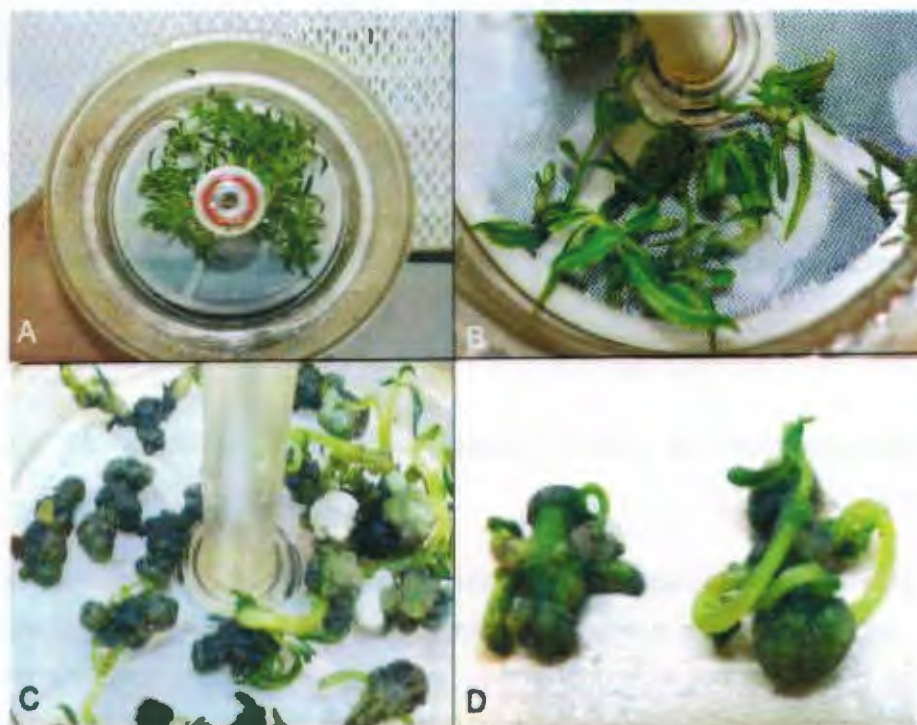
Nodo	Porcentajes de brotación					
	Frecuencia de inmersión					
	1 min/4 h		1 min/8 h		1min/12 h	
	S/dicamba	C/dicamba	S/dicamba	C/dicamba	S/dicamba	C/dicamba
1	80	25	100	70	100	85
2	95	50	100	90	100	100
3	75	65	35	95	100	100

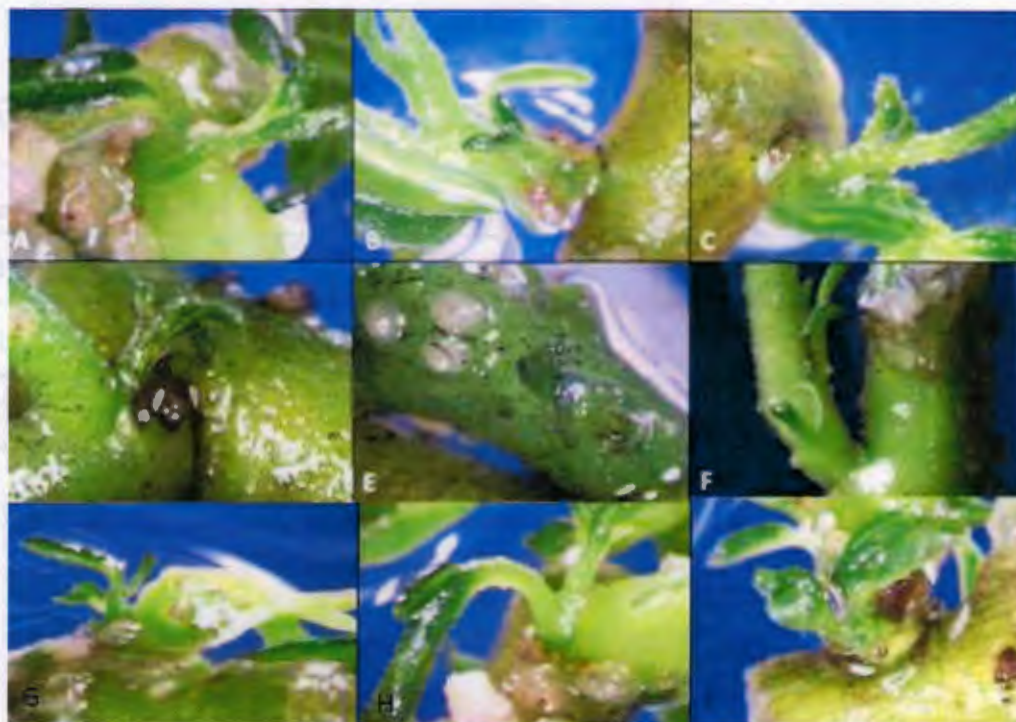
La yema 1 a la frecuencia de 8 horas para el medio libre de regulador (Fig. 11 D) alcanzó un promedio de 3.8 brotes por explante, 3.1 para la yema 2 (Figura 11 E) y 1.1 en la yema 3 (Figura 11 F). La frecuencia de 12 horas es donde se muestra el promedio más alto de brotes por explante con 4.4 para la yema 1(Figura 11G) seguido por la yema 2 (Figura 11 H) y 3 (Figura 11 I) con 2.7 explantes. Mroginsky *et al.*, 2003 descubrió que los segmentos nodales provenientes de plantas con 1 año de edad de Cedro australiano (*Toona ciliata*), la yema apical mostró ser la más factible para la propagación con un promedio de 4 brotes por explante mientras la yema cotiledonar mostró el promedio más bajo con 1 brote promedio por explante, contrastando con lo obtenido en este trabajo donde la yema cotiledonar mostró ser la más adecuada para continuar con la propagación *in vitro*.



**Cuadro 9.** Número promedio de yemas inducidas a diferentes frecuencias de inmersión.

Yema	Semisólido	RITA® (-) (4 horas)	RITA® (+) (4 horas)	RITA® (-) (8 horas)	RITA® (+) (8 horas)	RITA® (-) (12 horas)	RITA® (+) (12 horas)
1	1.6	1.8	2	3.8	1.5	4.4	1.9
2	1.8	2.8	1	3.1	1.3	2.7	1.5
3	1.5	3.1	1.3	1.1	1	2.7	1.7

**Figura 10.** A y B) Inducción de la yema 1 sin regulador a las 6 semanas; C) y D) Inducción de la yema 1 a las 6 semanas con regulador dicamba (13.57µm)



**Figura 11.** Inducción de brotes en sistemas RITA a diferentes frecuencias de inmersión sin regulador de crecimiento: A, B y C) Yema 1 a 4, 8 y 12 horas; D, E, y F) Yema 2 a 4, 8 y 12 horas; Yema 3 a 4, 8 y 12 horas

### 3.3.3. Multiplicación de brotes preexistentes en sistemas de inmersión temporal RITA®

Durante esta fase de propagación se evaluó el potencial de producción de brotes del explante bajo la forma de cultivo en medio semisólido y líquido. En el cuadro 10 se muestra los resultados obtenidos durante la fase de multiplicación, comparando la yema cotiledonar (número 1) a diferentes frecuencias y con medio semisólido se obtuvo un promedio de 3.9 brotes por explante en la frecuencia de 12 horas contra 1.8 brotes que presentó el medio semisólido. Para la yema 2 se obtuvo un máximo de 2.8 brotes promedio para las frecuencias de 4 y 8 horas y el mínimo de brotes se presentó en el medio semisólido con 1.4. La yema 3 presentó resultados favorecedores a la frecuencia de 4 horas con 2.3 brotes promedio por explante y el medio semisólido solo presentó 1 brote como máximo, confirmando la influencia del medio líquido sobre una respuesta



favorable en el desarrollo de los explantes. Esto coincide con lo reportado en varias especies, principalmente *Eucalyptus* spp, donde el cultivo en sistemas de inmersión temporal ha logrado un aumento en la tasa y reducción en el tiempo de multiplicación comparado con el medio semisólido (Castro y González, 2002). McAllister (2005) encontró en diferentes clones de *Eucalyptus*, donde obtuvo el doble de brotes con respecto al medio semisólido, esto pudiera deberse a que el medio líquido permite la absorción de nutrientes y reguladores de crecimiento por toda la superficie del tejido, lo que puede maximizar el desarrollo del explante.

El máximo de brotes promedio obtenidos fue de 3.9 en explantes nodales a una frecuencia de 12 horas, coincidiendo con lo reportado por Orellana (1997), donde encontró que las yemas de brotes cotiledonares mostraron ser las más eficientes para la etapa multiplicación, ya que al menos existen dos yemas latentes con diferentes etapas ontogénicas dentro de cada nodo, lo que le provee una ventaja sobre otro tipo de yemas diferentes ontogénicamente que solamente llegan a poseer una yema latente. Demostró la influencia del uso de frecuencias distanciadas y menor tiempo de inmersión, los brotes presentaron mejores características morfológicas y ausencia de vitrificación, porque posiblemente una de las ventajas del sistema RITA® es la eliminación de las posibilidades de hiperhidricidad (Teisson *et al*, 1995). En la figura 12 A se puede observar la multiplicación de la yema 1 en sistemas RITA® donde se muestran las características de un desarrollo normal de las hojas y en la 12 B el explante con diferentes yemas desarrolladas.

La ventaja de estos resultados comparándolos con otros trabajos realizados para esta especie es el desarrollo favorable de los explantes en cada una de las etapas de la micropropagación en sistemas RITA®. La mayoría de los resultados reportados por diversos autores (Peña *et al*, 2010; Andrade, 2002) utilizan el medio semisólido para llevar la inducción y la multiplicación de los explantes usando diferentes reguladores de crecimiento vegetal que les permite aumentar la producción de brotes.

**Cuadro 10.** Multiplicación de yemas en sistemas RITA® con diferente número de yema y frecuencias de inmersión

YEMA	NO. DE EXPLANTES INICIALES	SISTEMAS DE CULTIVO			
		NÚMERO PROMEDIO DE BROTES			
		SEMISÓLIDO	INMERSIÓN TEMPORAL (RITA®)		
			FRECUENCIAS DE INMERSIÓN		
			1 MIN/4 H	1MIN/8 H	1MIN/12 H
1	20	1.8	2.6	3.7	3.9
2	20	1.4	2.8	2.8	1.7
3	20	1	2.3	2	2.2

La fase de elongación es una etapa importante para el desarrollo de los brotes ya que es una etapa de acondicionamiento previo para el enraizamiento. Se comparó la influencia de las diferentes frecuencias sobre la elongación de las yemas, el cuadro 11 muestra la frecuencia de 4 horas no se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) donde la yema 3 alcanzó un tamaño promedio de 1.85 cm. En la frecuencia de 8 horas la yema alcanzó un tamaño promedio de 4.3 cm, el cuál presento una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con la yema tres que alcanzó un promedio de 3.2 cm. En la frecuencia de 12 horas no se encontró diferencias significativas entre el tamaño promedio de brote presentando un tamaño máximo de 3.1 cm en la yema 1. Se han realizado diversos trabajos para la elongación de brotes en sistemas de inmersión temporal, de los cuáles podemos destacar el realizado por Peña et al., 2010 donde reporta en sistemas BioMINT® se logró el crecimiento de brotes de cedro rojo con un tamaño promedio de 11 cms a las 6 semanas utilizando 9µm de GA<sub>3</sub>. En este trabajo no se utilizó ningún regulador de crecimiento para esta etapa de la micropropagación, Orellana (1997) reporta el uso del medio WPM en presencia de carbón activado y libres de reguladores de crecimiento en sistemas RITA® los cuales permitieron la sobrevivencia del 100 % de los explantes, y el tamaño promedio de brotes fue de 1.5 cm para la yema cotiledonar con un tiempo de inmersión 1 minuto cada 5 días.

En la fase de enraizamiento (Cuadro 12) el mayor porcentaje se presentó en la frecuencia de 4 horas, en la yema 1 (Figura 13 A, B y C) se obtuvo un promedio del tamaño de brote de 2.3 cms mientras la yema 2 (Figura 13 D, E y F) presento 1.4 cms no habiendo diferencia significativa entre estos dos tratamientos pero si en el tratamiento de la yema 3 (Figura 13 G, H, I) donde el tamaño promedio de raíces fue de 0.8 cm. Peña et al., 2010 reporta que en sistemas BioMINT® el tamaño de las raíces fue tres veces mayor comparado con el medio semisólido, mientras que Orellana (1997) observo que en presencia de medio WPM adicionado con carbón activado y sin la presencia de ningún tipo de regulador se logró que el 10% de los brotes presentaran raíces, lo cual constituye una ventaja para la fase enraizamiento. Existen muchos factores químicos y físicos que favorecen el enraizamiento *in vitro*. El estrés hídrico, la alta temperatura, la oxigenación, la baja intensidad de luz y el uso del carbón activado son factores físicos que estimulan el enraizamiento. Diversos autores reportan la influencia positiva de la adición de carbón activado al medio de cultivo, ya que su efecto en la reducción de la luz en la base de los brotes promueve la acumulación de auxinas, cofactores fotosensitivos y la absorción de productos tóxicos y de inhibidores de formación de raíces adventicias (Dumas y Monteuis, 1995).

La fase de aclimatación es muy importante para la sobrevivencia de la planta, ya que es la adaptación del organismo a un cambio de ambiente (Brained y Fuchigami, 1981). Se presentó un bajo el porcentaje de brotes que formaron raíces pero en el cuál se obtuvo una sobrevivencia exitosa de las plántulas durante esta fase (Figura 13 A) hasta de un 93% en la yema 1 con una frecuencia de 4 horas (Tabla 10) (Figura 13 B), la yema 2 (Figura 13 C) presento un 60 % y la 3 (Figura 13 D) fue de 43%, en todas ellas se presentó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Estos resultados resultaron similares a los obtenidos por Peña et al., 2010 que lograron aclimatar el 98% de sus plántulas obtenidas por medio de sistemas BioMINT®. Se reportan para otras especies leñosas bajos porcentajes de aclimatación como en *Quercus robur* L con una sobrevivencia del 21% y caoba con un 27% (Meier- Dinkel et al., 1993; Orellana, 1997).



**Cuadro 11.** Tamaño promedio de brotes provenientes de diferentes tratamientos y frecuencias de inmersión

Frecuencias de inmersión	Tamaño promedio del brote (cm)		
	Yema 1	Yema 2	Yema 3
4	1.71 <sup>a</sup>	1.74 <sup>a</sup>	1.85 <sup>a</sup>
8	4.3 <sup>a</sup>	3.9 <sup>ab</sup>	3.2 <sup>b</sup>
12	3.1 <sup>a</sup>	1.1 <sup>b</sup>	0.98 <sup>b</sup>

Nota: Las letras simbolizan las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ )

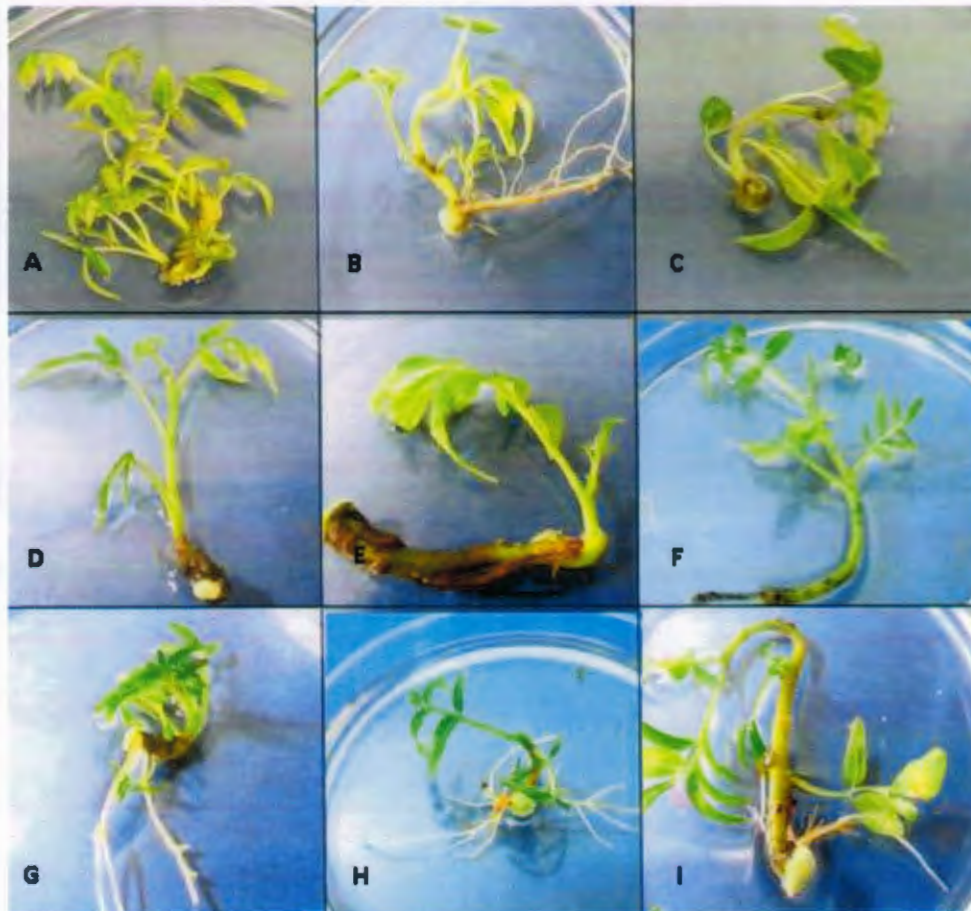
**Cuadro 12.** Tamaño promedio de raíces, número de brotes aclimatados y porcentaje de aclimatación

Yema	Tamaño promedio de raíces por brote	No. de brotes aclimatados	% de aclimatación
1	2.3 <sup>a</sup>	13/14	93% <sup>a</sup>
2	1.4 <sup>a</sup>	3/5	60% <sup>b</sup>
3	0.8 <sup>b</sup>	3/7	43% <sup>c</sup>

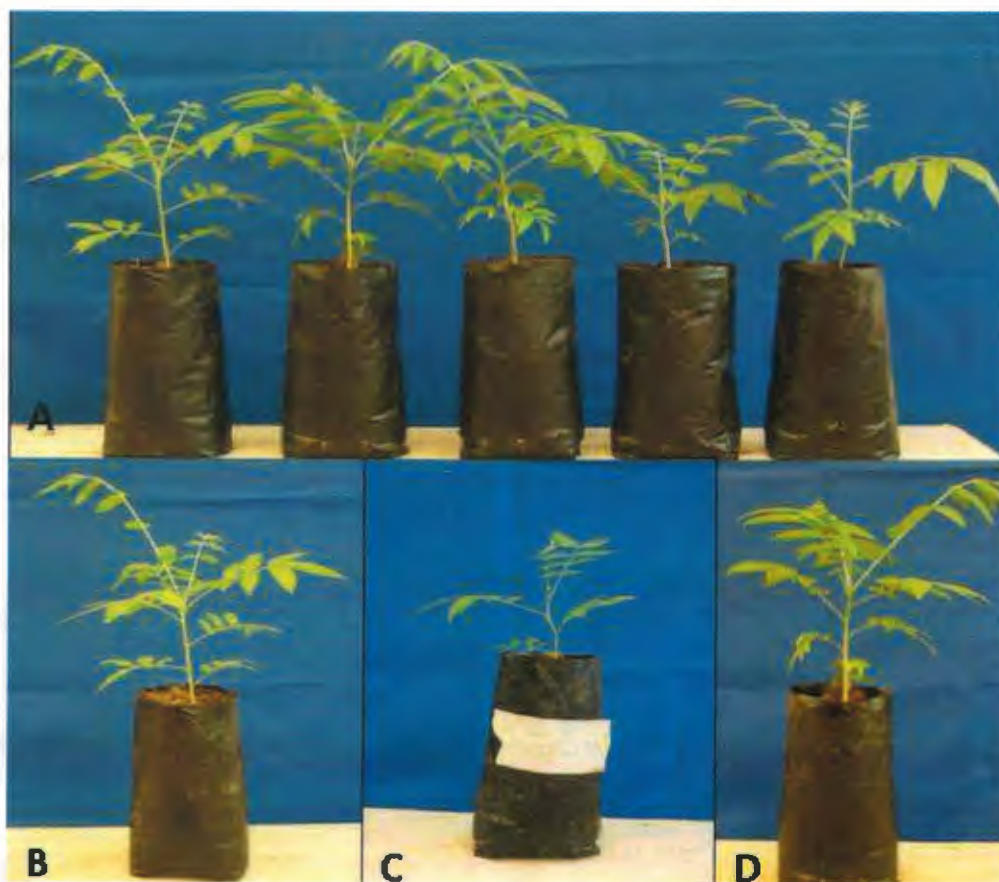
Nota: Las letras simbolizan las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ )



**Figura 12.** Multiplicación de yemas en sistemas RITA® de la yema 1 a una frecuencia de 4 horas:  
A) Brotes multiplicados en los biorreactores y B) Brotes multiplicados



**Figura 13.** Elongación y enraizamiento de brotes *in vitro* en sistemas RITA® a diferentes frecuencias de inmersión: A, B y C) 4 horas; D, E y F) 8 horas; G, H y I) 12 horas



**Figura 14** Aclimatización de plántulas in vitro: A) Desarrollo de plantas a los 4 meses de su adaptación; B) Planta proveniente de la yema 1; C) Plántula proveniente de la yema 2; D) Plántula proveniente de la yema 3.

### 3.4. CONCLUSIONES

- La yema cotiledonar es una buena fuente de explante primario ya que presenta una inducción del 100% en sistema semisólido y en sistemas de inmersión temporal RITA®
- Los largos períodos de aireación estimulan una mayor respuesta en la inducción y multiplicación de yemas preexistentes
- Un período de 2 minutos de inmersión provoca la vitrificación de los explantes, por lo que un período de 1 minuto es ideal para obtener plantas más desarrolladas y vigorosas
- La multiplicación de los brotes fue posible sin el uso de ningún tipo de regulador de crecimiento vegetal
- Los brotes de mayor tamaño se presentaron en la yema cotiledonar (1) y yema 2, por lo que son adecuadas para continuar con el proceso de micropropagación
- Es posible inducir el enraizamiento de brotes procedentes de material juvenil en sistemas de inmersión temporal RITA®



### 3.5. BIBLIOGRAFIA

- Aitken-Christie J, Kozai T & Takayama S (1995) Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. In: Aitken-Christie J, Kozai T & Smith MAL (eds) Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 1-18.
- Alvard, D; Cote, F; Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 32: 55-60.
- Andrade T. A. (2002). Micropropagación de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) como herramienta para su manejo. Programa de Agroecosistemas Tropicales. Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz.
- Berthouly M y H Etienne. (2005). Temporary immersion system: A new concept for use liquid medium in mass propagation. In Hvostlef-Eide A, W Preil eds. Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Dordrecht, Netherlands. Springer-Verlag. pp. 165-196.
- Brainerd, K, E; Fuchigami, L. H. (1981). Aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *J. Amer. Soc. Sci.* 106 (4). 515-518.
- Castro D, J González. (2002). Eucalyptus (*Eucalyptus grandis* Hill. ex Maiden.) en el sistema de inmersión temporal. *Agricultura Técnica* 62(1): 68-78.
- Dumas, E; Monteuis, O. (1995): *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: Influence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 40: 231-235
- Etienne, H. y M. Berthouly (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 69: 215–231; 2002
- González, R; Delgado, M; González Y, González, A; Garriga, M; Caligari, P; Carrasco, P; Quiroz, K. (2011). *In vitro* Propagation of Cedar (*Cedrela odorata* L.) from Juvenile Shoots. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 71(3):376-382
- George; E.F. ; P.C. Debergh . (2003). Micropropagation: Uses and Methods; in: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, George, E.F.; Hall, M.A. and G-J De Klerk (eds). Springer. Netherland. pp.29-64
- Jimenez, E; Pérez, N; de Feria, M; Barbón, R; Capote, A; Chávez, M; Quiala, E; Pérez, J. (1999). Improved production of potato microtubers using the temporary immersion

- system. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 59: 19-23.
- Juárez, J. (2008). Desarrollo de un protocolo para la micropropagación de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) empleando biorreactores de inmersión temporal BioMINT®. Tesis Ingeniería. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan
- McAllister, B.; Finnie, J.; Watt, M.; Blakeway, F. (2005). Use of temporary immersion bioreactor system (RITA) for the production of commercial *Eucalyptus* clones at Mondi Forests (SA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81: 1–12.
- Meier- Dinkel, A.; Becker, B.; Duckstein, D. (1993). Micropropagation and *ex vitro* rooting of several clones of late- flushing *Quercus robur* L. *Ann. Sci For.* 50 (1): 319-322.
- Mroginsky, E.; Mroginsky, L.; Hebe, R. (2003). *In vitro* plantlet regeneration from Australian Red Cedar (*Toona ciliata*, Meliaceae). *New Forests*. 25: 177-184.
- Orea-Coria, D.; Villalobos, V. (1985). Micropropagación de especies forestales, In: *Fundamentos teóricos-prácticos de cultivo de tejidos vegetales*. Ed. VM Villalobos. Chapingo, México. 220 pp
- Orellana, M.A.: (1997). Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro para los explantes nodales de caoba (*Swetenia macrophylla* King). Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 94 pp.
- Pierik R.L. (1997). *In Vitro* Cultures of higher plants. Dordrecht, Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers. 326 p.
- Robert M.L., Herrera-Herrera, J., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M., y Fuentes-Carrillo, P. (2006 b). A new temporary bioreactor immersion system for micropropagation in plant cell culture protocols. Loyola, y Vazquez Flota Eds. Humana Press. pp.399.
- Smith, L.; Spomer, A. (1995). Vessels, gels, liquid media, and support systems. In: Aitken-Christie, J.; Kozai, T.; Smith, M. A. L., eds. *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 371–404.
- Teisson, C., y D. Alvard (1995). In vitro production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato research*. 42: 499-504.
- Ziv, M. (1995 b). The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Hort*. 319: 25–38.
- Ziv, M. (2000). Bioreactor technology for plant micropropagation. *Horticultural Reviews*. Wiley& Sons, Inc. Jerusalem, Israel. V. 24. p. 1-30.

## IV. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS GENERALES

### 4.1. DISCUSIÓN GENERAL

El cedro es una especie forestal, una de las más importantes desde el punto de vista comercial, por lo cuál ha sido muy importante en el desarrollo de la industria maderera; esto ha influenciado en la explotación irracional sobre los mejores individuos, la cual deriva en la pérdida de las características más destacadas de esta especie por la tala selectiva, por lo cual es necesario la conservación de la diversidad genética.

La estrategia que se ha implementado en este trabajo para la obtención de material de buena calidad, es seleccionar árboles plus que posean características fenotípicas deseables como describe Mesén (1994) los cuáles presenten buena forma, libre de enfermedades, sin bifurcaciones así como buenos productores de semillas, para permitir a corto y mediano plazo la conservación, selección y uso de las mejores fuentes de germoplasma.

Algunos autores como García *et al*, 2011, Peña *et al* y Valverde *et al*, 1998 han reportado el uso de semillas como material de partida para la micropropagación de cedro rojo, esto debido a la problemática que presenta el tejido adulto limitada por factores como la contaminación y la presencia de fenoles en sus tejidos (Naik *et al*, 2009).

La influencia del origen del explante es uno de los principales factores de estudio para la micropropagación de especies forestales, porque de ella depende el potencial que un explante pueda presentar para su multiplicación *in vitro* (Orellana, 1997). Para la micropropagación de cedro a partir de plántulas germinadas *in vitro*, los resultados mostraron que la mejor fuente de explante son las yemas que se encuentran en el nudo cotiledonar, este mismo resultado se reportan en varias especies forestales como *Toona ciliata* (Mroginsky, 2003); *Swetenia macrophylla* (Orellana, 1997); *Theobroma cacao* (Aguilar, 1992) que han mostrado que este explante tiene una gran potencial para la micropropagación.

El uso de sistemas de inmersión temporal RITA® ha probado ser eficiente en la propagación de diversas especies vegetales de importancia comercial como *Ananas*

*comosus* (Escalona *et al*, 1999); *Solanum tuberosum* (Teisson y Alvard, 1999); *Dioscorea cayanensis* (Polzin *et al*, 2014); en especies forestales podemos encontrar a algunas especies del género *Eucalyptus* (González, 2011; McAlister, 2005); *Swetenia macrophylla* (Orellana, 1997) entre otras. Son diversos los factores a considerar en cada una de las etapas de la micropropagación como los volúmenes de medio y el número de explantes en el recipiente tanto en el inicio como en las subsiguientes etapas de cultivo, los regímenes de inmersión a la que se encuentran sometidos ya que permite la retención de medio por capilaridad en la superficie del explante y el intercambio gaseoso es favorecido con respecto a una inmersión total (Akin-Idowu *et al*, 2009; Albarran *et al*, 2005; Teisson y Alvard, 1995).



## 4.2. PERSPECTIVAS GENERALES

Actualmente existen varias limitantes para el aprovechamiento de cedro rojo como especie destacada dentro del ámbito forestal, ya que en los últimos años la pérdida de características deseables por la industria maderera como árboles de fuste recto y resistente a enfermedades se ha agravado por la tala selectiva y la sobreexplotación de la especie.

Para llevar actualmente una selección de características se reconoce que la propagación vegetativa y la selección clonal son los que ofrecen los medios para lograr las características buscadas en un menor tiempo, pero hay que tener en cuenta que aunque el material colectado de la planta madre va a hacer de buena calidad, en caso del cedro rojo hasta ahora no se ha logrado llevar a cabo con gran éxito la introducción de material *in vitro* debido a alto grado de contaminación y recalcitrancia de esta especie, por lo que la selección de árboles de buena calidad fenotípica para la obtención semillas como fuentes de explante nos permite explorar las condiciones ideales para el desarrollo de esta especie en un ambiente *in vitro* y sería muy importante continuar con la colecta de estas semillas en los árboles seleccionados y comparar el comportamiento del material durante varias temporadas.

Es necesario realizar un estudio más profundo de las condiciones en cada una de las etapas de la micropropagación en los biorreactores de inmersión temporal como por ejemplo: disminuir el tiempo en el desarrollo de las yemas preexistentes a través del uso de reguladores de crecimiento vegetal y probar con otros tipos de medios de cultivo como el Woody Plant Medium ya que es específico para especies leñosas.

Es importante también estudiar más a detalle cuáles son las mejores condiciones para la aclimatización del material *in vitro*, ya que esto permitiría mejorar las tasas de sobrevivencia y adaptación de las plántulas al medio exterior. A largo plazo sería ideal estudiar las plantas a nivel de campo para comparar sus características fenotípicas con las de la planta madre.

### 4.3. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, M., N. Vasquez y V.M. Villalobos (1992). Production of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via micrografting of somatic embryos. *In vitro cellular & Developmental biology*, 28(1), 15-19.
- Akin-Idowu, E., O. Ibitoye y O. T. Ademoyegun (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African. Journal of Biotechnoloy*, 8 (16), 3782-3788.
- Alabarrán J., B. Bertrand B., M. Lartaud y H. Etienne (2005). Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant. Cell.Tissue and Organ.Culture*, 81 (1), 27-36.
- Escalona, M., J.C. Lorenzo., B. González., M. Daquinta ., J. L. González .,Y. Desjardins y C. G. Borroto (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18, 743-748.
- García-Gonzáles., R; M. Delgado., Y González., A. González., M. Garriga., P. Caligari., P. Carrasco y K. Quiroz (2011). *In vitro* Propagation of Cedar (*Cedrela odorata* L.) from Juvenile Shoots. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 71(3), 376-382.
- Gonzalez, R., D. Ríos., F. Avilés y M. Sánchez (2011). In vitro multiplication of *Eucalyptus* globulus by temporary immersion system. *Bosque*, 32 (2), 147-157.
- McAlister, B., J. Finnie., M. Watt y F. Blakeway (2005) . Use of temporary immersion bioreactor system (RITA) for the production of commercial *Eucalyptus* clones at Mondi Forests (SA) .*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 1–12.
- Mesen, F (1994). Clasificación de fuentes de producción de semillas forestales, *In memoria: Curso nacional sobre identificación, selección y manejo de rodales semilleros*.DIGEBAS-PROSEFOR-CATIE .Baja Verapaz, Guatemala. Pp. 29-45
- Mroginsky, E., L. Mroginsky y R. Hebe (2003). *In vitro* plantlet regeneration from Australian Red Cedar (*Toona ciliate*, Meliaceae). *New Forests*, 25, 177-184.

- Naik D., D. Singh., V. Vartak., S. Paranjpe S y S. Bhargava (2009). Assessment of morphological and genetic diversity in *Gmelina arborea* Robx. *New Forests*, 2009, 3, 99-115
- Orellana, M. (1997). Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla* King). Tesis de Maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Costa Rica. 94 p.
- Peña-Ramírez, Y., J. Juárez., L. Gómez., J. Jerónimo., I. García., J. González y M.L. Robert (2010). Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L) cultured in vitro using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for highly valuable tropical tree species. *In vitro Cellular Developmental Biology- Plant*, 46(2), 149-160.
- Polzin, F., I. Sylvestre., E. Déchamp., P. Ilbert., H. Etienne y F. Engelmann (2014). Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA®). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(2), 210-216.
- Teisson, C y D. Alvard (1995) A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: Temporary immersion. In: *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, Dordrecht, Terzi M, (ed). Kluwer Academic Publishers, pp.105-110.
- Teisson, C y D. Alvard (1999). In vitro production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato Research*, 42(3), 499-504.
- Valverde, L., M. Dufour, M y V. Villalobos, (1998). In vitro organogénesis in *Albizia guachapele*, *Cedrela odorata* and *Swietenia macrophylla* ( Fabaceae; Meliaceae. *Revista de Biología Tropical*, 46 (2), 225-228.

### **PROCEDIMIENTO PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE CEDRO ROJO EN BIORREACTORES RITA®**

En base a los resultados obtenidos en este trabajo hasta el momento se recomienda llevar a cabo los siguientes pasos para la obtención de plántulas en sistemas de inmersión temporal RITA®:

A) Seleccionar árboles con características destacadas con un fuste recto de 4 metros aproximadamente o más si es posible, sin bifurcaciones en el tronco, libre de enfermedades y se encuentre en etapa reproductiva, en este caso para la obtención de las semillas que es el material de partida para este procedimiento



B) Se recomienda colectar los frutos entre los meses de marzo y mayo, tiempo en que se encuentran en proceso de maduración. Estos frutos pueden ser cortados con una herramienta llamada perico o en su caso si se cuenta con una persona profesional que pueda subir al árbol. Una vez que se han colectados los frutos, estos deben secarse al sol hasta su apertura y las semillas deben ser resguardadas en una caja preferentemente de unicel a la cual se le debe aplicar fungicidas comerciales como antak® y manzate® en una proporción de 3 gr o dependiendo de la cantidad de semillas que se desea almacenar. Se recomienda el uso de las semillas durante los tres primeros meses desde



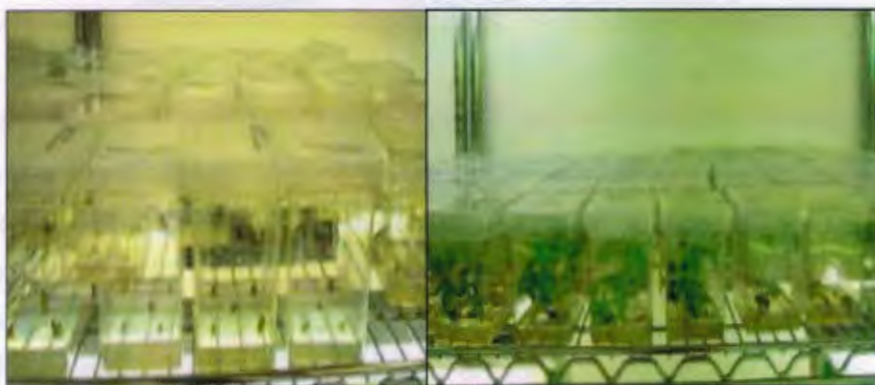
su colecta, debido a la pérdida de viabilidad.



C) Para germinar las semillas *in vitro* se recomienda primero retirar el ala y lavarlas con agua corriente y jabón y luego sumergiéndolas en agua con Tween 20® y Extran® (5 ml/L de c/u) con agitación constante durante 30 minutos. Posteriormente se deben sumergir en agua con antifúngicos Antak® y Manzate® (1 g/L) durante 12 horas. Dentro de una campana de flujo laminar, se elimina la solución de fungicidas con agua destilada estéril y sumergir nuevamente en una solución de cloro comercial (30%) y agua estéril durante 20 minutos agitando constantemente cada dos minutos. Finalmente, enjuagar con agua estéril tres veces o más si es necesario hasta eliminar cualquier residuo que haya quedado en las semillas.



D) La germinación de las semillas *in vitro* se pueden llevar a cabo en cajas magentas o en frascos gerber adicionadas con un medio de cultivo semisólido que es preparado como se describe a continuación: medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (4.3 g/L), sacarosa (30 g/L), VI vitaminas (10ml/L), phytigel (1.75 g/L), agar (1.75 g/L). ). Los parámetros ambientales para su germinación son las siguientes: temperatura  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , intensidad lumínica  $70 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$  luz blanca de lámparas tubulares fluorescentes con fotoperiodo de 16 horas de luz por 8 horas de oscuridad, con humedad relativa de 40%. Se recomienda poner 5 semillas de cada caja magenta o 3 en cada frasco gerber e incubar por un tiempo de 30 días o los necesarios para poder obtener los segmentos nodales de las plántulas.

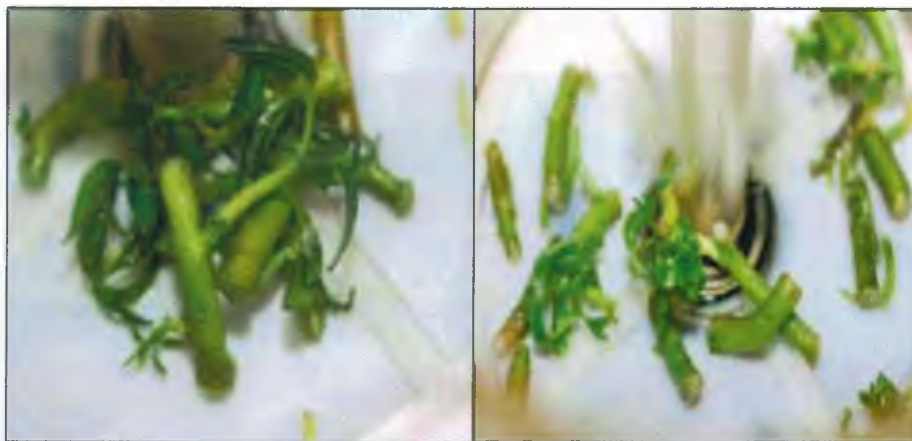


F) Para la etapa de inducción se recomienda colocar 20 segmentos nodales en cada biorreactor RITA ®. Cada envase debe contener 200 ml de medio líquido, el cual es similar al utilizado durante la germinación, a diferencia este medio no contiene gelificante y se le añade carbón activado (1g/L) para evitar la oxidación de los tejidos.





G) La etapa de la inducción de yemas en los biorreactores se lleva a cabo durante 6 semanas. El tiempo de inmersión debe ser de 1 minuto cada 12 horas para un buen desarrollo de las yemas. Pasado este período, las yemas que alcancen un tamaño promedio de 0.5 cm deben ser separadas del explante original para ser usadas en la siguiente etapa.



H) Para continuar con la producción plantas a partir del crecimiento repetido de yemas axilares, explantes provenientes de la inducción de aproximadamente 0.5 cm de longitud deben ser transferidos a un sistema de inmersión temporal RITA®. Se recomienda colocar 20 yemas en cada biorreactor usando 200 ml de medio de cultivo líquido similar al de la etapa de establecimiento. El tiempo de inmersión para esta etapa es de 1 minuto y frecuencia cada 12 horas durante 6 semanas. Durante esta etapa en caso de que se presente una elongación de las yemas se puede seguir multiplicando bajo las mismas condiciones o si se presenta enraizamiento las plantas pueden ser adaptadas para su crecimiento *ex vitro* tal como se describe en el inciso I.



l) Para la aclimatación de los brotes que elongaron y presentan enraizamiento, estas pueden ser transferidas a bandejas con posetas y colocarlas individualmente en un sustrato de una combinación de peat moss y tierra en proporciones 1:1. Las plantas deben cubiertas con plástico transparente para evitar la deshidratación y regarlas todos los días durante dos semanas o hasta que las plantas muestren ser vigorosas. Posteriormente, cuando las plantas alcancen un tamaño de unos 10 cm es recomendable pasarlas a bolsas plásticas negras y tierra para continuar su crecimiento



El método de propagación expuesto en este trabajo es más eficiente que otros métodos convencionales disponibles para esta especie. Este sistema basado en cultivo *in vitro* tiene el potencial de generar plantas en sistemas de inmersión temporal como los biorreactores RITA® donde la inducción de yemas puede alcanzar hasta un 100% en un tiempo de 4 semanas, cuando otros sistemas como el medio semisólido solamente se ha alcanzado hasta un 90% de respuesta durante este mismo tiempo por lo que lo hace ideal para esta etapa. Al igual la multiplicación se puede alcanzar una tasa eficiente en la producción de yemas sin el uso de reguladores de crecimiento vegetal (RCV), aunque es recomendable probar en esta etapa distintos RCV para incrementar la producción en este sistema. Otra gran ventaja de este método es que se puede llevar a cabo la elongación y enraizamiento de las yemas, por lo tanto permite obtener una planta completa de un tiempo estimado de 12 semanas utilizando solamente un tipo de sistema en este caso los biorreactores RITA®.





