

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES  
CENTRO DE ESTUDIOS FORESTALES DE POSTGRADO

**ENSAYOS DE MICROPROPAGACION  
IN VITRO DE *Cedrela odorata* L.**

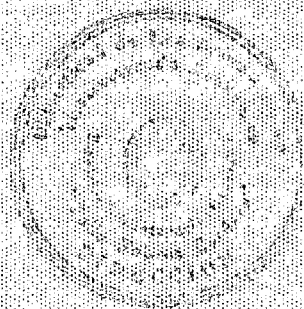
Por: Noralba Angarita de  
Torres

Prof. Tutor:  
MSc. Idel Contreras

Tesis presentada como requisito para la obtención  
del grado de Magister Scientae en  
Manejo de Bosques

Fecha: **08 FEB 1996**

Mérida, octubre de 1995



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de  
Cultivos **in vitro** de la Facultad de Ciencias  
Forestales de la Universidad de Los Andes.

## AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes, por el financiamiento de este proyecto (FO-327-94-10-D).

Especial agradecimiento al Profesor Idel Contreras G., Tutor de esta tesis, ejemplo de dedicación y constancia, por su valiosa orientación.

A mi Profesor Guía: Armando Briceño Vergara, por su preocupación constante y gran apoyo.

Al grupo de investigación del Laboratorio de Cultivos *in vitro*, Profesores: Lino Valera y Esthela Berbesí, Licenciado Gerardo Albarran y Bachiller Richard Medina por el aporte de valiosas sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Al personal técnico del Laboratorio de Cultivos *in vitro*: Nestor Olivo y Jonathan Almeida por su valiosa colaboración y apoyo.

A todos ellos mi más sincero agradecimiento.

## RESUMEN

Con el fin de estandarizar una metodología para micropropagación de *Cedrela odorata* L. se ensayaron varios métodos de esterilización para diferentes tipos de explantes, se evaluaron varios antioxidantes y se utilizaron métodos de propagación directa e indirecta utilizando como explantes: semillas, embriones zigóticos maduros e inmaduros y yemas apicales.

El análisis de los resultados determinó que el método más efectivo de esterilización para las semillas es el hipoclorito de sodio a una concentración de 4,25% con dos gotas de tween 20 y vacío 15 minutos. Este mismo método fue igualmente efectivo para los embriones maduros, pero seguido de un tratamiento con ampicilina en dosis de 50 mg/l durante períodos de 1, 2 a 3 días. Las yemas apicales fueron esterilizadas óptimamente con  $\text{HgCl}_2$  (Cloruro de Mercurio) al 0,05% y 300 mg/l de ampicilina por 15 minutos. El medio básico fue MS (1962) suplementado con diferentes concentraciones de fitoreguladores: 2,4-D (2,4-Acido diclorofenoxiacético), AIB (Acido Indolbutírico), TDZ (Tidiazuron) y BA (Bencil-Adenina). El medio se solidificó en agar (B&T) 1%. Las porciones embrionales se incubaron, unos en oscuridad, otros a 400 - 500 lux y fotoperíodo 16/8 horas a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ . Los embriones maduros en oscuridad callificaron óptimamente en 2,4-D 4 mg/l. Al ser subcultivados en un medio fresco sin hormonas se produjo rizogénesis. Los embriones inmaduros callificaron en 2,4-D, 6 mg/l y produjeron raíces en un medio fresco sin hormonas. Explantes de embriones inmaduros en AIB 0,05 mg/l y TDZ 0,10 mg/l produjeron yemas **de novo** directamente, las que enraizaron en el mismo medio. Aquellos explantes en TDZ y AIB 0,20 mg/l: 0,10 mg/l también generaron yemas las cuales enraizaron en medio fresco sin hormonas. El porcentaje de sobrevivencia de las plantas producidas **in vitro** y aclimatadas al ambiente de invernadero fue de 100%.

Palabras Clave: *Cedrela odorata*, Micropropagación, yemas **de novo**.

## SUMMARY

In order to establish a methodology for micropropagation of *Cedrela odorata* L., (Cedro) several methods of sterilization were tested for various explants. To prevent browning, different antioxidants were probed and direct and indirect propagation methods were used, taken as explants: seeds, mature and immature zygotic embryos and apical buds.

Analysis results established that, the most effective sterilization method for seeds was sodium hypochlorite 4,25% with two drops of Tween 20 and vacuum 15 minutes. The same method was effective for mature embryos but only after following an antibiotic treatment with 50 mg/l of Ampicillin for 1, 2 to 3 days.

Successful sterilization of apical buds was achieved with  $\text{HgCl}_2$  (Mercuric Chloride) 0,05% and 300 mg/l Ampicillin for 15 minutes. MS (1962) was used as medium with different concentrations of growth regulators: 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), IBA (Indolbutyric acid), TDZ (Thidiazuron) and BA (Benzyladenine). Medium was solidified on agar (B&T) 1%. The embryo explants were stored. Some were kept in the dark others in 400 - 500 lux and photoperiod 16/8 hours with  $26 \pm 2$  °C. Mature embryos in darkness produced callus in 2,4-D, 4 mg/l.

After excision of the callus and their transfer on MS without growth regulators development of roots was achieved. Immature embryos produced callus on 2,4-D, 6 mg/l and roots were developed in MS without growth regulators.

**De novo** adventitious shoots were obtained from immature embryos explants on IBA 0,05 mg/l and TDZ 0,10 mg/l which developed roots in the same medium. Those explants on IBA 0,20 mg/l and TDZ 0,10 mg/l produced buds as well, which formed roots on MS without growth regulators.

Whether plantlets originated from germinated **in vitro**-seeds or shoots of immature embryos, they acclimatized well to the greenhouse and the survival rate was 100%.

**Key Words:** *Cedrela odorata*, micropropagation, **de novo** shoot buds.

www.bdigital.ula.ve

# INDICE

	pag.
INDICE DE TABLAS .....	ix
INDICE DE FIGURAS .....	x
I. INTRODUCCION .....	1
II. OBJETIVOS .....	4
2.1 Objetivo General .....	4
2.2 Objetivos Específicos .....	4
III. MARCO TEORICO .....	5
3.1 Micropropagación .....	5
3.2 Tipos de Micropropagación .....	5
3.2.1 Alargamiento de Yemas Axilares .....	5
3.2.1.1 Juvenilidad y madurez .....	7
3.2.2 Organogénesis .....	8
3.3 Micropropagación de Especies Forestales .....	10
3.4 Micropropagación de Especies Forestales Foraneas y Nativas .....	13
3.5 Cultivo de Tejidos en Especies Meliaceae .....	14
3.6 Descripción General de la Especie .....	15
3.6.1 Taxonomía .....	15
3.6.1.1 <i>Cedrela odorata</i> L. ....	15
3.6.2 Distribución .....	15
3.6.3 Descripción Botánica .....	16
3.6.4 Suelos y Fisiografía .....	17
3.6.5 Silvicultura .....	17

IV. MATERIALES Y METODOS .....	19
4.1 Material Vegetal .....	19
4.1.1 Explantes .....	19
4.2 Métodos .....	19
4.2.1 Esterilización del Material Vegetal .....	19
4.2.1.1 Semillas para Germinación <b>in vitro</b> .....	19
4.2.1.2 Semillas para Extracción y Cultivo de Embriones	
Zigóticos Maduros .....	20
4.2.1.3 Frutos para Extracción y Cultivo de Embriones	
Inmaduros de <i>C. odorata</i> L. ....	22
4.2.1.4 Esterilización de Yemas Apicales de <i>C. odorata</i> L. ....	23
4.3 Preparación de los Medios de Cultivo .....	24
4.4 Obtención de Plantas Fuente a partir de Semillas Germinadas	
<b>in vitro</b> .....	25
4.5 Métodos de Propagación Indirecta .....	25
4.5.1 Inducción de Callos .....	25
4.5.1.1 Cultivo de Embriones Zigóticos Maduros .....	25
4.5.1.2 Cultivo de Embriones Maduros Tratados con	
Antibiótico .....	27
4.5.1.3 Cultivo de Embriones Zigóticos Inmaduros .....	27
4.6 Propagación Directa .....	28
4.6.1 Formación de Plantas <b>de novo</b> a partir de Embriones	
Zigóticos Inmaduros .....	28
4.6.2 Cultivo de Yemas Apicales .....	28
V. RESULTADOS .....	29



<b>VI. DISCUSION</b> .....	42
6.1 Método de Esterilización .....	42
6.2 Producción <b>in vitro</b> de Plantas Fuente .....	44
6.3 Propagación Indirecta .....	44
6.3.1 Inducción de Callos .....	44
6.4 Propagación Directa .....	46
6.4.1 Obtención de Plantas Fuente <b>de novo</b> a partir de Embriones Inmaduros de <i>C. odorata</i> L. ....	46
6.4.2 Cultivo de Yemas Apicales .....	48
6.5 Aclimatación de las Plantas Producidas <b>in vitro</b> al ambiente de invernadero .....	49
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	51
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	53
<b>ANEXO</b> .....	59

## INDICE DE TABLAS

	<b>pag.</b>
Tabla N° 1. Resumen de medios y componentes utilizados .....	26
Tabla N° 2. Obtención de plantas a partir de semillas maduras .....	29
Tabla N° 3. Efecto de la aplicación de un antibiótico en la eliminación de bacterias y sobre-vivencia de embriones zigóticos maduros .....	30
Tabla N° 4. Efecto de la auxina 2,4-D sobre inducción de callos y morfogénesis en embriones zigóticos maduros .....	31
Tabla N° 5. Inducción de callos y morfogénesis a partir de embriones zigóticos inmaduros .....	34
Tabla N° 6. Formación de plantas a partir de explantes de embriones inmaduros .....	36
Tabla N° 7. Subcultivo y enraizamiento de vástagos obtenidos a partir de embriones inmaduros tratados con TDZ + AIB .....	36

## INDICE DE FIGURAS

	pag.
Fig. 1. Callogénesis y rizogénesis a partir de embriones maduros de Cedro .....	32
Fig. 2. Callogénesis y rizogénesis a partir de embriones inmaduros de Cedro .....	33
Fig. 3. Neoregeneración de brotes a partir de embriones inmaduros de Cedro .....	37
Fig. 4. Vástagos de Cedro enraizados .....	38
Fig. 5. Inducción de yemas adventicias de Cedro en embriones inmaduros .....	39
Fig. 6. Plántulas de Cedro en diferentes estadioscreciendo en vermiculita estéril .....	40

## I. INTRODUCCION

La explotación selectiva de algunas especies forestales consideradas valiosas por sus características maderables y que implica la extracción de los mejores árboles, es una práctica ampliamente extendida en la mayoría de los bosques tropicales del mundo, que puede conducir a la desaparición de algunas de ellas.

Según Rodríguez (1980), *Cedrela odorata* L., una de las especies más fuertemente explotadas en el país, ha sufrido una disminución considerable de su existencia natural en todos los bosques tropicales del mundo. Melchior y Quijada (1972), hicieron un estudio comparativo sobre el comportamiento de algunas procedencias de *Cedrela odorata* con *Cedrela angustifolia* y advirtieron que la explotación constante y la falta de una repoblación, ya fuera natural o artificial, de esta especie, estaban creando el peligro de su desaparición en el mercado nacional. Esta situación se agrava debido a la sensibilidad que presentan las plantaciones puras de esta especie al ataque de *Hypsipyla grandella* Zeller, un insecto conocido como "el barrenador de las Meliáceas". Es frecuente que el cultivo de *C. odorata* resulte arriesgado a consecuencia del ataque de las larvas de *Hypsipyla* en las plantaciones jóvenes (Lamb, 1969). Por otro lado, Roovers (1971), observó que los ataques de las larvas de este insecto en árboles jóvenes limitan su crecimiento y le dan un aspecto defectuoso, también causan una ramificación excesiva y pueden llegar a detener su desarrollo.

Lo expuesto anteriormente presenta dos problemas: por un lado, la desaparición progresiva de la especie a causa de una explotación selectiva, lo cual trae como consecuencia, la eliminación de fuentes de material genético y la destrucción de combinaciones valiosas, tanto en crecimiento y desarrollo, como en resistencia a plagas y enfermedades, y por otro lado, se restringe la posibilidad de establecer programas de mejoramiento genético para la especie (Melchior y Quijada, 1972).

Durante la Quinta Reunión del Cuadro de Expertos de la FAO en Recursos Genéticos Forestales en 1981, *Cedrela odorata* L. fue incluida en la lista de especies prioritarias (FAO, 1984 citado por Lahera et al., 1995).

De acuerdo a Finol y Melchior (1970), la posibilidad más común de preservar especies para futuros trabajos de mejoramiento genético, consiste en el almacenamiento de semillas de individuos, razas y poblaciones de valor comercial o potencial en condiciones adecuadas, las cuales deben garantizar la conservación de la vitalidad y el germoplasma por muchos años. Sin embargo, estos mismos autores señalan que también se puede aprovechar la capacidad de propagación vegetativa de muchas de las especies latifoliadas tropicales.

Esta capacidad de propagación vegetativa de la mayoría de las plantas ha conducido, en los últimos 25 años a la utilización de las técnicas de cultivo de tejidos, para la propagación de una gran variedad de plantas, incluyendo plantas leñosas. La nueva tecnología de propagación vegetativa (estacas, plántulas de cultivo de tejidos o cultivos embriogénicos) puede acelerar mucho la distribución del logro genético. La regresión de la madurez (envejecimiento fisiológico) o el control de la maduración mediante criopreservación, pueden ayudar a garantizar el avance genético frente a lo que puede ser una limitación biológica frustrante (Burdon, 1995). La propagación *in vitro* o micropropagación presenta inigualables ventajas para la multiplicación clonal de especies forestales, destacando, entre otras, que posee una alta calidad regenerativa, requiere de poco tiempo y espacio y, dependiendo del sistema de micropropagación, permite conservar las características genéticas de los progenitores (Villalobos, 1985). Por otro lado, la utilización de cultivo de tejidos y la clonación, para la repoblación de los bosques, tan devastados en algunas regiones, daría la oportunidad, no sólo de abreviar los períodos de tiempo en silvicultura, sino también la selección, multiplicación y propagación adecuada de especímenes de gran valor genético (Zeledon, 1988). Una vez que la tecnología para la regeneración de plantas a partir de cultivo de tejidos se haya establecido, luego sería posible intentar la manipulación para el mejoramiento genético (Ahuja, 1993).

El presente trabajo consistió en el establecimiento de métodos para la micropropagación clonal de *Cedrela odorata* L. y la aplicación de diferentes técnicas de cultivo de tejidos a diferentes tipos de explantes obtenidos de semillas o de plántulas producidas *in vitro*. Los resultados de esta investigación podrán ser, en el futuro, complementarios a los programas de mejoramiento genético de esta especie y también contribuirán a incrementar el conocimiento en la investigación sobre micropropagación de plantas leñosas de interés forestal que se lleva a cabo en el Laboratorio de Cultivos *in vitro* de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Los Andes.

www.bdigital.ula.ve

## II. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar diversos métodos de cultivo de tejidos, utilizando diferentes explantes de *C. odorata* L., con el objeto de establecer técnicas apropiadas para la micropropagación de esta especie.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar un método de esterilización superficial adecuado a cada tipo de explante utilizado.
- Evaluar diferentes antioxidantes para disminuir la oxidación y el ennegrecimiento de los explantes.

#### Propagación directa:

- 1) Intentar la micropropagación clonal rápida, utilizando como explantes, yemas apicales y segmentos nodales obtenidos de plántulas germinadas *in vitro*.
- 2) Cultivar embriones maduros e inmaduros de *C. odorata* L. en medios de cultivo específicos.

#### Propagación indirecta:

- 1) Inducir la morfogénesis a partir de callos producidos de embriones maduros o inmaduros de *C. odorata* L.

### III. MARCO TEORICO

#### 3.1 MICROPROPAGACION

Villalobos y Thorpe (citados por Villalobos, 1985), definen la micropropagación como la multiplicación masiva de una planta **in vitro** a partir de células, tejidos u órganos; lo cual implica la desinfección superficial del explante y su proliferación en un medio de cultivo sintético y bajo condiciones físicas controladas. En base de estas particularidades, la micropropagación consiste en la formación o desarrollo de meristemas o meristemoides, cada uno de los cuales es potencialmente una planta.

Como alternativa a otros métodos de propagación vegetativa, la ventaja de la micropropagación vegetativa estriba en su capacidad de multiplicar a gran escala genotipos superiores (Haines, 1994).

#### 3.2 TIPOS DE MICROPROPAGACION

Los tres tipos principales de micropropagación son: el alargamiento de yemas axilares, organogénesis y embriogénesis somática.

##### 3.2.1 Alargamiento de yemas axilares

Se produce cuando yemas axilares, normalmente inactivas son liberadas de la dominancia apical mayormente mediante la manipulación con hormonas (principalmente citocininas) en el medio nutritivo. Este método de propagación es más comúnmente usado con latifoliadas que con coníferas (Bonga and Von Aderkas, 1992). Este método es preferido para la propagación comercial de especies latifoliadas porque generalmente es la técnica disponible más fácil de desarrollar y debido a que mantiene la estabilidad genética mejor que la propagación vía organogénesis (McCown and McCown, 1987 citado por Bonga and Von Aderkas, 1992).



El principal incentivo para clonar árboles maduros es captar combinaciones genéticas que impartan características superiores al árbol y que son susceptibles de ser perdidas durante la recombinación sexual. Sin embargo, existen otras razones para desear clonar árboles elite maduros. Algunas especies son masculinas o femeninas estériles o pueden formar semillas que son difíciles de germinar, tales plantas sólo pueden ser propagadas por clonación. En otros casos la necesidad de clonación es aguda debido a que las especies están amenazadas de extinción. Otras especies, por otro lado, son pobres productoras de semillas y esta características las hace aptas para la clonación masiva. Sin embargo, la clonación de árboles sexualmente maduros a través de la micropropagación es actualmente posible sólo en un limitado número de especies (Bonga and Von Aderkas, 1992).

Con árboles y otras plantas perennes, explantes de crecimiento juvenil son más probables de desarrollar tejidos regenerativos que aquellos provenientes de plantas adultas. Los tejidos juveniles son a veces observables como brotes naturales unidos a una planta adulta, por ejemplo: vástagos en la base de los árboles maduros. Frecuentemente una reversión de adulto a juvenil puede lograrse por medio de tratamientos químicos o ambientales o mediante injertos. Finas diferencias en la edad ontogenética del tejido, órgano o planta, puede tener una posterior influencia aún en material juvenil. Organos de plantas removidos tempranamente después de su iniciación en la planta, tienden a ser mejores explantes que aquellos que han alcanzado un desarrollo más avanzado. Mientras la totipotencialidad es una cualidad inherente de las células vegetales, su expresión parece reprimirse progresivamente con la maduración del órgano adulto (Murashige, 1978). En general, explantes juveniles tales como embriones, cotiledones, epicotilos, hipocotilos o explantes de yemas axilares de plántulas tienen mejor respuesta *in vitro*, que aquellos que son tejidos, de por ejemplo, yemas axilares de árboles maduros. Por esta razón, los explantes juveniles se han utilizado extensivamente para la micropropagación de plantas leñosas (Bonga and Von Aderkas, 1992).

### 3.2.1.1 Juvenilidad y madurez

De acuerdo a Orea y Villalobos, (1985), durante su desarrollo, los vegetales pasan por una serie de estadios, cada uno con sus propias características morfológicas. Así, en los árboles se pueden reconocer dos estadios de desarrollo: el juvenil y el maduro. La juvenilidad se caracteriza por la forma de la hoja, el crecimiento vigoroso, la facilidad para formar raíces adventicias y la incapacidad para formar flores. Las partes superiores de un árbol maduro pueden formar flores, mientras las zonas cronológicamente más viejas en la base del árbol pueden retener características juveniles. Las partes superiores tienen una edad fisiológica más avanzada que las partes bajas, mientras las ramas laterales tienden a madurar de la base hacia la punta. De esta manera, aunque un árbol completo se considera maduro, algunas de sus yemas aun pueden retener características juveniles de acuerdo a su localización en el árbol y por lo tanto, las yemas adventicias que se deriven de éstas, exhibirán características de juvenilidad. Vástagos epicórmicos son por lo general juveniles y pueden ser usados para micropropagación. Otra fuente de tejido juvenil en árboles maduros, es la nucela. La poliembrionía adventicia ocurre naturalmente en la nucela de muchas especies de latifoliadas. Esta capacidad de la nucela para formar embriones, también es expresada *in vitro*. En particular si se cultivan las nucelas de árboles de especies poliembrionarias (Bonga and Von Aderkas, 1992).

Bonga (1987), recomienda que para aquellas especies para las cuales los métodos totales de rejuvenecimiento no están disponibles todavía, se deben seguir las siguientes reglas:

- 1) Colectar los tejidos somáticos más juveniles posibles:

La mayor parte del trabajo de micropropagación *in vitro* se realiza con ápices de vástagos. Como se puntualizó anteriormente, la posición dentro del árbol por lo general tiene un efecto diferente en los ápices de los vástagos más jóvenes que se originan en las yemas suprimidas en la parte más baja del tronco o de yemas adventicias (esferoblastos). Además para colectar los ápices de los vástagos desde la posición más juvenil dentro del árbol, el período de colección es también un factor crítico. En las

coníferas se han encontrado que los vástagos escindidos de yemas vegetativas tienen dos períodos durante su ontogenia en los que ellos tienen una más alta capacidad morfogénica que en otros períodos. Estos períodos generalmente coinciden con la iniciación de las yemas laterales. Parece ser que la plasticidad morfogénica es común en primordios jóvenes de muchas plantas y que esta plasticidad puede ser aprovechada para la micropropagación.

2) Tamaño del explante:

Mediante la reducción del explante al tamaño más pequeño que pueda sobrevivir y crecer en cultivo, los controles correlativos impuestos por otros tejidos y células vecinas, son reducidas al mínimo. Para muchas especies, tal miniaturización de los explantes ha resultado en un mejoramiento de la micropropagación.

3) Evitar tejidos con historia de un patrón de desarrollo fuertemente fijado.

4) Las condiciones de cultivo deberían estar ajustadas a los diferentes tipos de explantes.

### 3.2.2. Organogénesis

Comprende la diferenciación de microvástagos y raíces en diferentes períodos de tiempo durante el desarrollo de las plantitas. Generalmente la formación de los microvástagos se induce sobre los tejidos cultivados en medios nutritivos enriquecidos con citocininas y posteriormente son enraizados en un medio enriquecido con auxinas, para dar lugar a las plantitas (Ahuja, 1993). En 1957, Skoog y Miller mostraron que la formación de raíces y vástagos en callos de tabaco, podía ser regulada mediante suplementos nutritivos de dos sustancias hormonales: Auxinas y Citocininas; ambas sustancias eran necesarias para el desarrollo de callos sin embargo, una alta proporción Auxina/Citocinina favorecía la formación de raíces, mientras que lo contrario estimulaba la formación de vástagos. Esta demostración de Skoog y Miller es la base de los métodos de propagación que emplean la secuencia de formación de vástagos individuales. La obtención de plantas a través de la formación en

secuencia de vástagos y raíces, demuestran indirectamente la totipotencialidad de las células vegetales. Su más directa demostración es proporcionada por el fenómeno de embriogénesis somática o asexual en la cual diminutas plantas con vástago y raíz se originan de células diferentes a cigotos fertilizados (Murashige, 1978).

A diferencia de la organogénesis donde la formación de vástagos y raíces se desarrolla en dos medios diferentes, la embriogénesis somática es aparentemente un proceso de un solo paso donde se desarrollan embriones que tienen los dos polos, vástago y raíz tal como en un embrión cigótico (Ahuja, 1993).

Para el propósito de la propagación clonal en plantas leñosas, la organogénesis ha sido más comúnmente empleada para micropropagación. La embriogénesis somática todavía está en la fase de desarrollo, sin embargo, existen ventajas evidentes en la micropropagación vía embriogénesis somática; por un lado, los embriones somáticos pueden crecer en un medio líquido y así sería posible desarrollar una producción de embriones en biorreactores. Por otro lado, los embriones somáticos pueden ser encapsulados para producir semillas sintéticas, las cuales pueden ser almacenadas o sembradas como semillas naturales (Ahuja, 1993).

Los eventos tempranos en la organogénesis **de novo** pueden ser divididos en diferentes fases, basados en las respuestas de los explantes que se encuentran en cultivo (Thorpe y Prakash, 1993).

De acuerdo a Christianson y Warnick (1983), estos eventos se presentan como sigue:

**Inducción:** En el más amplio sentido de desarrollo este evento es visto como un cambio en el destino de una célula o grupo de células. En el caso de la organogénesis de vástagos **in vitro** a partir de explantes de hojas, la inducción resulta en células de hojas que dan a lugar a células determinadas para la organogénesis de vástago.

**Determinación:** Es un proceso que inicia un camino específico de desarrollo por simple escogencia de una, entre las muchas posibilidades para las cuales un sistema celular es

competente. En el caso de la organogénesis de vástagos *in vitro*, la determinación tiene un punto final experimentalmente reconocible: el explante producirá vástagos aunque el medio nutritivo sea reemplazado por un medio básico.

**Competencia:** Es un pre-requisito para la ocurrencia de una determinación específica, es difícil separarla de la determinación en sí. En un momento particular, un tejido se hace competente para ciertos procesos de determinación y no para otros. La determinación implica cambios en la competencia también.

Los estados de competencia, inducción y determinación no siempre se reflejan por cambios morfológicos y su ocurrencia sólo puede ser verificada mediante la manipulación experimental (Ahuja, 1993). La organogénesis, sin embargo, está grandemente influenciada por el genotipo, el estado fisiológico del explante, la edad del explante y el ambiente *in vitro*, es decir, en particular la concentración de hormonas.

### 3.3 MICROPROPAGACION DE ESPECIES FORESTALES

La producción en masa, por medio de cultivos *in vitro* es de gran importancia en la clonación forestal para superar restricciones tales como obtención o aprovisionamiento de semillas, problemas de germinación, períodos de regeneración, etc. (Mascarenhas et al., 1993). Durante la última década se han hecho considerables esfuerzos para aplicar métodos de cultivo de tejidos para la multiplicación rápida de especies arbóreas y de acuerdo a las diversas investigaciones se ha llegado a determinar que un buen número de especies forestales pueden ser utilizadas para micropropagación. Así, estas técnicas han sido aplicadas con bastante éxito en muchos árboles, fundamentalmente especies de ciertas Gimnospermas y unas pocas Angiospermas (Mascarenhas, 1987).

Con el objeto de producir en masa clones con características superiores, se han desarrollado métodos de cultivos *in vitro* para especies arbóreas latifoliadas, haciendo énfasis en aquellas que se caracterizan por su rápido crecimiento y de las cuales se tiene un buen registro de su importancia comercial y de reforestación y en las que los métodos de propagación

ya sea por semillas o propagación vegetativa convencional presentan dificultades o han fracasado. Así, por ejemplo, entre las especies latifoliadas de importancia que han sido objeto de investigación, se encuentran algunas Angiospermas de zonas templadas y especies tropicales importantes. De los trabajos más destacados realizados en especies latifoliadas de la zona templada se pueden citar entre otros la propagación rápida de árboles maduros de *Populus tremulus* y sus híbridos demostrada por Ahuja, (1984), citado por Ahuja, (1987).

Bates et al., (1992), en estudios más recientes sobre *Fraxinus americana* reportaron la inducción de yemas adventicias, vástagos y embriones somáticos sobre callos, hipocotilos y epicotilos de plántulas originadas a partir de semillas maduras e inmaduras en un medio nutritivo suplementado con Tidiazuron. Contreras y Olivo (1993), utilizando semillas inmaduras de *Fraxinus americana* en medio básico MS suplementado con diferentes concentraciones de Tidiazuron reportaron la obtención de vástagos sobre callos formados en hipocotilos, los cuales fueron enraizados y aclimatados a condiciones de invernadero.

Sin embargo, el trabajo realizado con árboles tropicales es bastante limitado si se compara con lo que se ha realizado en especies arbóreas de la zona templada. La investigación en árboles tropicales incluye especies de importancia comercial y especies útiles para la reforestación y recuperación de tierras devastadas. Gupta y Mascarenhas (1987), reportaron los resultados obtenidos en la propagación clonal rápida de árboles maduros de algunas especies de *Eucalyptus*, considerado actualmente como uno de los árboles más importantes disponibles para la explotación comercial, por sus características de rápido crecimiento, adaptabilidad climática y amplio rango de utilidad y el cual ha sido introducido en muchas partes del mundo para ser utilizado en programas de plantaciones forestales. Valera (1990), reportó resultados obtenidos en el establecimiento de métodos de micropropagación para *P. caribae* var. *hondurensis* y *Eucalyptus grandis* y presenta una extensa revisión de los trabajos realizados hasta la fecha en varias especies de este género. Lakshmi Sita (1993) hace una revisión de las últimas investigaciones realizadas en *Eucalyptus* donde destaca que la micropropagación por medio de estímulo de la ramificación axilar es la técnica de más éxito y la más explotada y que

la diferenciación vía organogénesis aunque ha sido explotada, no ha alcanzado el estado de comercialización. Gupta et al., (1980) y Mascarenhas et al., (1993), reportaron la micropropagación de árboles élite de 100 años de edad de *Tectona grandis*, un árbol tropical latifoliado bien conocido por la calidad de su madera. La micropropagación de Teca se ha logrado usando yemas apicales. Las plantas producidas se encuentran en la actualidad en proceso de evaluación de los ensayos de campo. Moura-Costa et al., (1993) describieron un sistema exitoso para inducir la embriogénesis somática a partir de explantes de embriones zigóticos maduros de *Ocotea catharinensis* una especie latifoliada de Brasil, ampliamente explotada en los bosques del Atlántico para la producción de madera.

#### Micropropagación de árboles fijadores de Nitrógeno:

Los árboles de leguminosas, fuertes, robustos y de crecimiento rápido que enriquecen el suelo con biofertilizantes de Nitrógeno son los candidatos principales para recuperar y reforestar zonas devastadas. Vibha Dhawan (1993) hace una revisión de la investigación en especies fijadoras de nitrógeno donde se incluyen aquellas cuyas raíces se asocian al actinomicete *Frankia* entre las cuales se encuentra el género *Alnus* y leguminosas que forman nódulos radicales en asociación con bacterias del género *Rhizobium* entre las cuales se encuentran especies de los géneros *Acacia*, *Albizzia*, *Sesbania*, *Robinia pseudoacacia*, *Prosopis*, *Dalbergia* y *Leucaena*, entre otras. Una de las especies más promisorias de las leguminosas tropicales con una gran versatilidad de usos para recuperación y reforestación de suelo degradados es *Leucaena leucocephala*. Desde 1979, varios investigadores han estudiado las respuestas *in vitro* de esta especie. Gonzales et al. (1993) realizaron ensayos de cultivos de tejidos de *L. leucocephala*, utilizando diferentes tipos de explantes (cotiledones, ejes embrionarios de semillas inmaduras de plantas relativamente jóvenes) en un medio MS (1962) suplementado con diferentes dosis de BA (Bencil-Adenina) o diferentes dosis de TDZ (Tidiazuron), logrando la multiplicación de yemas cotiledones y yemas axilares en explantes de ejes embrionarios. El enraizamiento de las yemas individualizadas se logró utilizando Ácido Naftalen-acético (ANA) 0,1 mg/l, logrando su aclimatación en condiciones de invernadero.

Contreras y Almeida (1995), utilizando explantes embrionales de semillas verdes de *L. leucocephala* germinadas ascépticamente en un medio MS (1962) con diferentes concentraciones de BA y TDZ combinados, lograron la formación de callos y la formación de yemas *de novo* a partir de explantes de epicotilos, logrando el enraizamiento de estas yemas individualizadas, unas en un medio fresco sin hormonas y otras en un medio MS/2 suplementado con 0,1 mg/l de Ácido naftalen-acético, lográndose un exitoso transplante en el suelo. Las evaluaciones de ensayos de campo están por determinarse a partir de plantas obtenidas *in vitro* y plantadas en parcelas en el campo.

### 3.4 MICROPROPAGACION DE ESPECIES FORESTALES FORANEAS Y NATIVAS

En Venezuela, la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos en la propagación de árboles de importancia comercial, se inició con los trabajos de Contreras y Valera (1988a), en el Laboratorio de Cultivos *in vitro* de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Los Andes, quienes establecieron métodos para micropropagación de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* y *P. oocarpa*, a estos trabajos siguieron otros como la propagación clonal rápida *in vitro* de *Eucalyptus globulus* (Contreras y Valera, 1988b). Propagación clonal rápida de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* y *Eucalyptus grandis* (Contreras y Valera, 1992). Propagación clonal de *Morus insignis* y *M. multicaulis* a partir de yemas laterales y obtención de plantas *de novo* a partir de lámina foliar (Contreras y Bustamante, 1992). Además de los trabajos ya mencionados de *Fraxinus* y *Leucaena*. Actualmente se continúa ensayando con especies foráneas entre las que se encuentran, especies de *Eucalyptus* (Medina, 1994 inform. pers.) y especies nativas como *Bombacopsis quinata* (Valera, 1994 inform. pers.) y las especies de Meliaceae *Cedrela odorata* y *Swietenia macrophylla*.



### 3.5 CULTIVO DE TEJIDOS EN ESPECIES DE MELIACEAE

Enriquez (1988), en México logró diferenciar plantas completas a partir de yemas apicales y subapicales de *C. odorata*. Lee and Rao (1988), en Singapur, India, reportaron la obtención de vástagos adventicios a partir de callos friables producidos en diferentes explantes tomados de diversas partes vegetativas de plántulas de *Swietenia macrophylla* (Caoba) cultivados en un medio MS (1962) suplementado con BA (Bencil-Adenina), los cuales pudieron ser enraizados y transferidos al suelo exitosamente.

Guevara et al., (1992), en Costa Rica muestran los resultados obtenidos al ensayar una metodología para la propagación masiva de *Cedrela tonduzii* (Cedro dulce), utilizando como explantes ápices, estacas y ápices con entrenudo, provenientes de plántulas de 6 meses de edad y la multiplicación de los vástagos a partir de estos explantes.

Albarrán (1995), en Venezuela (Laboratorio de Cultivos *in vitro*, Facultad de Ciencias), reportó resultados en la aplicación de métodos para optimizar el mayor número de condiciones que pudiesen influir en la regeneración *in vitro* y transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en plantas de *Swietenia macrophylla* (Caoba), usando como explantes; yemas apicales y laterales, segmentos nodales, discos foliares, cotiledones y semillas enteras cultivados en dos tipos de medio nutritivo: Medio para plantas leñosas (WPM) 1987 y Murashige Skoog (1962), a la mitad de concentración de sus sales y suplementado con diferentes reguladores de crecimiento solos o en combinación y bajo condiciones de luz y temperatura reguladas. La inducción de callos se produjo en segmentos nodales, discos foliares y porciones de cotiledones en un medio conteniendo de 0,02 - 0,04 mg/l de tidiázuron y 2 -- 5 mg/l de 2,4-D en condiciones de fotoperíodo. Brotes de yemas se produjeron en segmentos nodales, usando 2 mg/l de BA combinado con 2 mg/l de ANA. Aunque el tejido foliar de Caoba no mostró susceptibilidad a la transformación genética mediada por *A. tumefaciens*, sin embargo, se demostró el efecto inhibitorio de la kanamicina, 50 - 200 mg/l sobre los discos foliares y el efecto controlador de la necrosis por parte de la cefotaxima en un rango amplio,

100 - 500 mg/l, así como el daño causado por el tiempo de cultivo de la bacteria con el tejido vegetal.

### 3.6 DESCRIPCION GENERAL DE LA ESPECIE

#### 3.6.1 Taxonomía

El género *Cedrela* pertenece a la familia Meliaceae y está representada en Venezuela por 3 especies existentes en las selvas templadas, altas, húmedas y secas del país (Aristeguieta, 1973).

##### 3.6.1.1 *Cedrela odorata* L.

Fue descrita y clasificada por Linnaeus en 1759. Desde entonces, la especie ha sido descrita con diferentes nombres y se ha dado la misma clasificación a diferentes especies (Guevara, 1988). *Cedrela odorata* y *C. mexicana* son consideradas por algunos autores como dos especies diferentes, pero otros las consideran como variedades de una misma especie (Lamprecht, 1990). Sin embargo, Smith (1960) citado por Lamb (1969), debido a problemas de determinación de las especies de *Cedrela* no encontró evidencia para que se retuviera la especie *Cedrela mexicana*.

#### 3.6.2 Distribución

El Cedro está ampliamente distribuido en Latinoamérica, pero en áreas discontinuas; se encuentra aproximadamente, desde los 24° N hasta los 10° S, abarcando México, Centroamérica, las Antillas, el norte de Sudamérica, hasta alcanzar Perú y Brasil; media en altitudes de 0 hasta 1200 m (Lamprecht, 1990). Veillon (1986), reporta la distribución de *Cedrela odorata* en Venezuela en casi todo el territorio nacional en las zonas de vida BHT, BST, BHPM, BSPM y selvas nubladas del norte de Venezuela en un rango altitudinal de 0 - 1500 msnm.

### 3.6.3 Descripción botánica

De acuerdo con Lamb (1969) y Lamprecht (1990), la altura de esta especie varía según la procedencia y las condiciones medioambientales. En promedio crece hasta aproximadamente 30 m de altura y alcanza un DAP de 60 a 180 cm. En árboles excepcionalmente grandes, la base del fuste presenta a veces refuerzos parecidos a raíces tabulares que terminan en las raíces que se extienden superficialmente. El sistema radicular es generalmente superficial, excepto en los suelos arenosos profundos. Por encima de los refuerzos tabulares, el fuste es generalmente recto, y más o menos cilíndrico en los árboles bien desarrollados hasta 10 ó 15 metros de altura, arriba de los cuales se divide en grandes ramas ascendentes que soportan una copa extendida en forma de cúpula, con un follaje verde claro. Cuando el árbol tiene de 6 - 8 años, la corteza, generalmente de color gris pálido, se agrieta y las grietas se hacen más profundas con la edad. Recién cortada, la corteza tiene un olor desagradable.

Las hojas son alternas, paripinnadas y se componen de 5 - 12 (15) pares de foliíolos de opuestos hasta alternas, los cuales tienen forma ovalada a lanceolada, miden de 6 a 17 cm de largo y de 2,5 a 5,5 cm de ancho y son casi siempre pubescentes. El árbol es deciduo durante períodos que depende de la duración de la época seca del lugar donde crece. Las flores poco llamativas son de color blanco y están agrupadas en panículas. El fruto es una cápsula septicida de 5 - 7 cm de longitud, se abre desde el ápice hasta la base, exponiendo las muchas semillas aladas. Un fruto puede contener de 30 - 40 semillas fértiles. Las semillas de *Cedrela* pierden rápidamente su viabilidad si no están bien secas. Una atmósfera seca de 3 °C hasta 5 °C aseguran una germinación más elevada, después de un período de almacenamiento de dos semanas o más. Una característica importante es que las semillas son poliembrionarias. La germinación epígea necesita de 2 a 4 semanas.

### 3.6.4 Suelos y Fisiografía

De acuerdo a Guevara (1988), todos los estudios realizados a nivel mundial coinciden en cuanto a los requerimientos edáficos de la especie: los suelos deben ser fértiles, profundos, bien drenados, aireados, con buena disponibilidad de elementos mayores y bases intercambiables. El suministro de agua en el suelo es muy importante para el establecimiento y crecimiento del Cedro; el punto óptimo de la relación entre aireación y el agua del suelo, se alcanza en suelos aluviales francos donde la capa freática fluctúa con frecuencia, o en colinas y piedemonte de colinas con buen drenaje superficial, de bosque húmedos, muy húmedos o pluviales.

### 3.6.5 Silvicultura

Según Lamprecht (1990), el Cedro es una especie pionera longeva, encontrándose por ello en el piso superior del bosque natural. Se regenera abundantemente en los claros del bosque, en superficies anteriormente cultivadas y también bajo un dosel ralo en condiciones ambientales favorables. La repoblación natural se puede favorecer liberando árboles semilleros y abriendo paulatinamente el dosel. El Cedro alcanza la madurez reproductora a la edad de 15 años y luego fructifica abundantemente cada año o cada 2 años. En el vivero la semilla es sembrada con distanciamientos de 15\*20 a 20\*30 cm y a una profundidad aproximada de 1 cm. Con un sembrado leve y un riego diario, la germinación se produce de 2 - 4 semanas. Las plántulas crecen rápido y a los 3 meses ya alcanzan alturas de 40 a 50 cm, a los 12 meses de 130 a 150 cm. Para la plantación se utilizan plantas con cepellón "striplings" o pseudoestacas. Debido al rápido crecimiento de esta especie, también se puede realizar siembra directa.

El éxito logrado por los forestales en el cultivo de *Cedrela* en Africa, en contraste con la falta de éxito similar en Latinoamérica, se debe al hecho de que *Cedrela* no atrae a la mariposa africana y de la India (*Hypsipyla robusta*, Moore), mientras que sí atrae por su olor a la mariposa americana (*Hypsipyla grandella*, Zeller) (Lamb, 1969). Por ser altamente

susceptible a *Hypsipyla*, el Cedro no se debe plantar en rodales puros, sino en mezclas por ejemplo *Cordia alliodora* u otras especies adecuadas. La larva de este insecto barrena los brotes apicales aún no lignificados de los árboles jóvenes (hasta aproximadamente 4 m de altura) y devora la médula de arriba hacia abajo. Los brotes mueren y si el ataque continúa, conduce a la muerte del árbol o por lo menos a su achaparramiento. Hasta ahora no se cuenta con un método eficaz para combatir esta plaga (Lamprecht, 1990). Debido a la importancia de estos insectos para el éxito o fracaso de las plantaciones de *Cedrela*, ha sido necesario ampliar considerablemente los resúmenes sobre el conocimiento que se tiene acerca de *Hypsipyla*, tanto en los trópicos asiáticos y africanos como en los americanos (Lamb, 1969).

Según Roovers (1970), *Cedrela odorata* es preferida sobre otras especies de Meliaceae, como planta hospedera de larvas e insectos adultos de *Hypsipyla grandella*. Aunque en Venezuela se han hecho investigaciones sobre este insecto (Rodríguez Marciano, 1963; Ramírez Sanchez, 1966; Roovers, 1970), se requiere seguir investigando sobre este aspecto que ha sido una gran limitante para la propagación de la especie.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron semillas de *Cedrela odorata* L. seleccionadas por su calidad, recolectadas de árboles semilleros que crecen en Santa Rita, Estado Trujillo, almacenadas en el vivero de la Estación Experimental, Bun Bun, Estado Barinas y donadas por el Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables (M.A.R.N.R.). De estas semillas germinadas *in vitro*, se obtuvieron plantas a partir de las cuales se tomaron yemas apicales para ensayos de micropropagación.

#### 4.1.1 Explantes

Se utilizaron embriones zigóticos maduros, extraídos de las semillas seleccionadas y embriones zigóticos inmaduros que se obtuvieron de frutos con semillas inmaduras, recolectados de árboles que crecen en el patio de la Facultad de Ingeniería (ULA). De estos embriones inmaduros, cultivados *in vitro*, se obtuvieron plantas bien desarrolladas a partir de las cuales se tomaron igualmente, yemas apicales para ensayos de micropropagación.

### 4.2 METODOS

#### 4.2.1 Esterilización del material vegetal

##### 4.2.1.1 Semillas para germinación in vitro

La esterilización se realizó en dos etapas:

- 1.-
  - a) Eliminación del ala de la semilla con tijera.
  - b) Cepillado con detergente comercial. Enjuague 3 veces con agua corriente.
  - c) Cepillado con germicida comercial (Povidex). Enjuague dos veces con agua

corriente.

- 2.- a) Aspersión con alcohol de 70% por un minuto. Enjuague con agua destilada 2 veces.
- b) Lavado con solución de agua destilada y detergente líquido, agitando manualmente por 5 minutos. Enjuague con agua destilada 3 - 4 veces.
- c) Inmersión en solución fungicida (Benlate) 7 gr/l, agitando manualmente durante 5 minutos. Enjuague con agua destilada dos veces.
- d) Inmersión en Hipoclorito de Sodio al 4,25% y dos gotas de Tween 20 seguido inmediatamente por esterilización al vacío por 15 minutos.

#### 4.2.1.2 Semillas para extracción y cultivo de embriones zigóticos maduros

En este caso, se probaron varios métodos de esterilización superficial:

- 1) El método descrito anteriormente se ensayó introduciendo algunas variantes: en la primera etapa, las semillas fueron hidratadas por espacio de 2 - 3 horas antes de proceder a la segunda etapa.

En la segunda etapa se varió el tiempo de esterilización al vacío desde 15 hasta 7 minutos.

- 2) Se sustituyó el Hipoclorito de Sodio por Cloruro de Mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) cumpliéndose igualmente dos etapas como en el método anterior y siguiendo esta secuencia:
  - a) Primera etapa, igual a la anterior; pero dejando las semillas en agua destilada por 2 - 3 horas para su hidratación.
  - b) Inmersión en  $\text{HgCl}_2$  al 0,05% y dos gotas de Tween 20 por 8 minutos.
  - c) Enjuague 3 - 4 veces con agua destilada estéril, en el cuarto de cultivo.

Este procedimiento se repitió variando la concentración de  $\text{HgCl}_2$  a 0,1%.

- 3) Se combinaron ambos métodos, utilizando las dos sustancias de acuerdo al siguiente procedimiento:
  - a) La primera etapa igual a la descrita en el método anterior.
  - b) Aspersión con alcohol de 70% por un minuto. Enjuague con agua destilada 2 veces.
  - c) Inmersión en Hipoclorito de Sodio al 4,25% y dos gotas de Tween 20 y esterilización al vacío por 7 minutos.
  - d) Enjuague en el cuarto de cultivo 3 - 4 veces con agua destilada estéril.
  - e) Extracción de los embriones e inmersión en  $\text{HgCl}_2$  por 5 minutos. Enjuague 3 veces con agua destilada.
  - f) Escisión de los embriones para obtención de explantes:

En la cámara de cultivo se procedió a cortar los embriones por sus extremos y en los márgenes, obteniéndose pequeñas porciones rectangulares las cuales se colocaron una en cada tubo.

- 4) Aplicación de antibiótico:

La aparición sistemática de bacterias en los embriones zigóticos, después de su cultivo, hizo necesaria la aplicación de un antibiótico; para esto se utilizó Ampicilina y se ensayaron varias dosis, añadiéndolas a un medio líquido constituido por MS (1962), fórmula original completa suplementado con 100 mg/l de mioinositol, una mezcla de vitaminas: Tiamina 0,1 mg/l, Glicina 0,2 mg/l, Piridoxina 0,5 mg/l, Acido nicotínico 0,5 mg/l y 30 gr/l de Sacarosa. Las dosis de Ampicilina utilizadas fueron 25, 50, 75 y 100 mg/l. Los embriones, una vez extraídos de las semillas, se colocaron en fiolas de 125 ml (entre 15 - 30 embriones por fiola) conteniendo 25 ml del medio descrito y se dejaron



por espacio de 1 a 3 días en cada tratamiento con agitación continua de 50 rpm. Luego, los embriones eran cultivados en frascos de vidrio que contenían 10 ml de medio sólido, similar al medio líquido en su composición; pero sin antibiótico y al cual se le añadió 2, 4' - ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) en diferentes proporciones: 2 y 4 mg/l. Resultados obtenidos en la reducción de la contaminación por bacterias, se muestran en la Tabla 2.

#### **4.2.1.3 Frutos para extracción y cultivo de embriones inmaduros de *C. odorata* L.**

Para la extracción de los embriones inmaduros, sólo se esterilizó la cubierta del fruto y luego se procedió a la extracción de las semillas y los embriones en el cuarto de cultivo. Para esto se siguieron los pasos descritos a continuación:

- a) Cepillado con detergente líquido comercial. Enjuague 3 - 4 veces con agua corriente.
- b) Cepillado con solución germicida comercial (Povidex). Enjuague 2 veces con agua corriente.
- c) Inmersión en alcohol de 70%, agitando manualmente por 5 minutos. Enjuague 2 veces con agua destilada.
- d) Inmersión en solución fungicida (Benlate) 7 gr/l y agitación manual por 5 minutos. Enjuague 2 veces con agua destilada.
- e) Apertura del fruto y extracción de semillas y embriones en el cuarto de cultivo.
- f) Escisión de los embriones para la obtención de explantes:

En la cámara de cultivo se procedió a cortar los embriones sus extremos y por los márgenes obteniéndose pequeñas porciones rectangulares las cuales fueron colocadas una en cada tubo.

#### **Escisión y traslado de explantes tomados de plantas fuente creciendo en el invernadero**

Los explantes tomados de las plantas producidas a partir de semillas germinadas *in vitro* y transferidas al invernadero, se trasladaron al laboratorio en un beaker que contenía una solución con ácido ascórbico (100 ppm) y ácido cítrico (150 ppm) como antioxidantes.

##### **4.2.1.4 Esterilización de yemas apicales de *C. odorata* L.**

Las yemas fueron esterilizadas de acuerdo al siguiente procedimiento:

- a) Enjuague con agua destilada.
- b) Inmersión en Povidex por 3 minutos. Enjuague con agua destilada 2 veces.
- c) Inmersión en fungicida (Benlate) 7 gr/l por 15 minutos. Enjuague con agua destilada una vez.
- d) Inmersión en solución con Ampicilina 300 mg/l por 15 minutos. Enjuague una vez con agua destilada.
- e) Inmersión en  $\text{HgCl}_2$  al 0,05% por 15 minutos. Enjuague 3 - 4 veces con agua destilada estéril.

Este mismo procedimiento fue utilizado para los explantes tomados de plántulas producidas a partir de embriones inmaduros y crecidas en el cuarto de incubación, bajo condiciones asépticas; obviando la primera parte (utilización de ácido ascórbico y ácido cítrico).

En el cuarto de cultivo las yemas se prepararon cortando las primeras hojas (cuando estaban muy desarrolladas) y eliminando el extremo del pecíolo antes de su cultivo. Esta operación se realizó manteniendo las yemas sumergidas en una solución de PVP

(Polivinilpolipirrolidona), 2 gr/l.

### 4.3 PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se prepararon siguiendo los procedimientos comúnmente utilizados. El medio básico para todos los tratamientos fue el MS (1962), fórmula original completa para todos los medios excepto el medio para yemas apicales ( $M_{12}$ ), en el cual este medio se usó a  $\frac{1}{2}$  concentración. Para cada tipo de explante se preparó un medio específico así:

- Germinación de semillas in vitro ( $M_1$ ).
- Transferencia de plántulas de Cedro ( $M_2$ ).
- Cultivo inicial de explantes de embriones zigóticos maduros ( $M_3$ ).
- Medio con antibiótico para la eliminación de bacterias en embriones zigóticos maduros ( $M_4$ ).
- Cultivo de embriones zigóticos maduros tratados con antibióticos ( $M_5$ ).
- Subcultivo de callos producidos a partir de embriones zigóticos maduros tratados con ampicilina ( $M_6$ ).
- Subcultivo de callos con morfogénesis (raíces) producidos a partir de embriones zigóticos maduros ( $M_7$ ).
- Cultivo de explantes de embriones zigóticos inmaduros ( $M_8$ ).
- Subcultivo de callos y vástagos formados a partir de embriones zigóticos inmaduros ( $M_9$  y  $M_{10}$ ).

- Cultivo de yemas apicales de Cedro ( $M_{12}$ ).

Todos los medios se esterilizaron a  $121^{\circ}\text{C}$  y  $1,05\text{ Kg/cm}^2$  y se dispensaron a razón de 10 ml por tubo de cultivo. Un resumen de los medios utilizados se presentan en la Tabla N° 1.

#### 4.4 OBTENCION DE PLANTAS FUENTE A PARTIR DE SEMILLAS GERMINADAS in vitro

El procedimiento seguido en el cultivo de las semillas para la obtención de plantas fuente fue el siguiente:

- Colocación de las semillas individualmente en tubos de cultivo conteniendo 10 ml de medio sólido (MS, 1962).
- Transferencia de las plántulas a los 8 días de germinadas, a frascos de vidrio que contenían medio sólido similar al anterior, cada frasco con 3 plántulas.
- Transferencia de plántulas a vermiculita estéril. Exposición a luz directa y mantenimiento en cuarto de incubación a una temperatura de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Riego periódico con agua corriente y aspersión con solución de Benlate 7 gr/l.
- Transferencia de plántulas a bolsas de polietileno con mezcla de tierra y arena estériles en proporción de 2:1. Exposición a luz indirecta. Riego periódico y aspersión con fertilizante foliar.

#### 4.5 METODOS DE PROPAGACION INDIRECTA

##### 4.5.1 Inducción de callos

##### 4.5.1.1 Cultivo de embriones zigóticos maduros

Los embriones zigóticos fueron extraídos de las semillas seleccionadas. Inicialmente

TABLA 1. RESUMEN DE MEDIOS Y COMPONENTES UTILIZADOS

Elementos Nutritivos	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>9</sub>	M <sub>10</sub>	M <sub>11</sub>	M <sub>12</sub>
Mioinositol mg/l	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Tiamina mg/l		0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4
Piridoxina mg/l			0.5	0.5	0.5	0.5		0.5	0.5	0.5	0.5	
Acido Nicotínico mg/l			0.5	0.5	0.5	0.5		0.5	0.5	0.5	0.5	
Glicina mg/l			0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
Sacarosa g/l	30	30	30	30	30	30	30	40	30	30	30	30
Ampicilina mg/l				25 50 75 100								
Bactoagar (%)	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	
2, 4-D mg/l			2 4		2 4			3 4 6				
TDZ mg/l			0.1 0.3					0.10 0.20 0.40			0.20 0.40	
BA mg/l							0.25				0.5 0.5	
AIB mg/l								0.05 0.10 0.20				

estos embriones fueron cultivados en cajas de Petri que contenían MS (1962) sólido con dosis diferentes de 2,4-D 2 y 4 mg/l. Estos embriones fueron cultivados en tubos de ensayo con el mismo medio.

#### **4.5.1.2 Cultivo de embriones maduros tratados con antibiótico**

A partir de embriones maduros, sometidos a tratamiento con Ampicilina, se indujo la formación de callos, transfiriendo estos embriones, desde el medio líquido con el antibiótico a un medio sólido de la misma constitución; pero sin el antibiótico y al cual se le añadió 2,4-D en concentraciones de 2 y 4 mg/l; estos embriones fueron cultivados en frascos de vidrio, 5 embriones por frasco y se incubaron en oscuridad total.

Una vez formados los callos, estos fueron separados en fracciones más o menos iguales y transferidos a tubos de ensayo que contenían un medio sólido igual al anterior; pero sin 2,4-D los cuales se dejaron en incubación con fotoperíodo de 16/8 h.

#### **4.5.1.3 Cultivo de embriones zigóticos inmaduros**

A partir de embriones zigóticos inmaduros se indujo la formación de callos. Para esto, se ensayó un medio sólido con diferentes concentraciones de 2,4-D: 3, 4 y 6 mg/l. y se indujo la formación de vástagos con un medio igual que contenía dosis diferentes de una combinación de TDZ (Tidiazurón) y AIB (Acido indolbutírico): TDZ 0,10 y AIB 0,05 mg/l; TDZ 0,20 + AIB 0,10 mg/l y TDZ 0,40 + AIB 0,20 mg/l.

Los callos formados a partir de embriones cultivados en un medio con diferentes dosis de 2,4-D fueron luego transferidos a otro medio sólido similar al anterior pero sin hormonas y los callos donde se observó la formación de raíces se pasaron a un medio conteniendo dos concentraciones de una combinación de TDZ y BA: TDZ 0,20 y BA 0,5 mg/l y TDZ 0,40 y BA 0,5 mg/l.

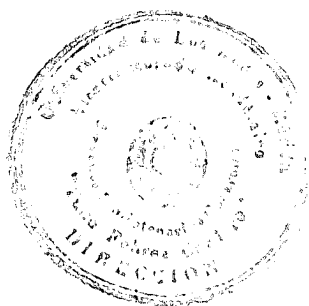
## 4.6 PROPAGACION DIRECTA

### 4.6.1 Formación de plantas de novo a partir de embriones zigóticos inmaduros

Aquellos embriones cultivados en un medio con diferentes concentraciones de una combinación de TDZ y AIB y que produjeron vástagos y con alargamiento del hipocotilo en la base del cual se produjo un callo, fueron escindidos y transferidos por separado a un medio sólido sin hormonas e incubados con fotoperíodo de 16/8 h.

### 4.6.2 Cultivo de yemas apicales

Las yemas apicales obtenidas de plantas crecidas en vivero o de plantas obtenidas a partir de explantes de embriones inmaduros y mantenidas en condiciones asépticas de incubación, fueron cultivadas en un medio líquido MS (1962) a 1/2 concentración de su fórmula original sin hormonas. Las yemas, una vez cultivadas se dejaban en incubación con un régimen luz tenue indirecta.



## V. RESULTADOS

A partir de la germinación de semillas maduras de *C. odorata* L. se obtuvieron plantas asépticas en buen estado de desarrollo, para ser utilizadas como plantas fuente para la obtención de explantes. La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos a partir de la germinación *in vitro* de estas semillas, con un porcentaje de germinación de 100%. En una semana se produjeron plántulas completas, las cuales permanecieron libres de agentes patógenos (hongos y/o bacterias) hasta el momento de ser transferidas al invernadero donde continuaron su desarrollo normal.

**TABLA 2. OBTENCION DE PLANTAS A PARTIR DE SEMILLAS MADURAS**

N de semillas	% de germinación	Agente Contaminante	
		Hongo	Bacteria
15	93	+	-
15	93,3	-	-
15	100	-	-

Semillas esterilizadas con hipoclorito de sodio 4,25% + Tween 20, 2 gotas y sometidas 15 min. al vacío.

Presencia de agentes contaminantes se indica con + y ausencia de los mismos con -.

La Tabla 3 muestra la respuesta de los explantes de embriones zigóticos maduros al tratamiento de esterilización.



**TABLA 3. EFECTO DE LA APLICACION DE UN ANTIBIOTICO EN LA ELIMINACION DE BACTERIAS Y SOBREVIVENCIA DE CALLOS DE EMBRIONES ZIGOTICOS MADUROS**

Antibiótico Ampicilina mg/l	Tiempo (Días)	Hongos	Bacterias	Sobrevivencia (30 días después)
25	1	+	+	-
	2	+	-	+
	3	-	-	+
50	1	-	-	+++
	2	-	-	+++
	3	-	-	+++
75	1	+	-	+
	2	-	-	+
	3	-	-	-
100	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-

- Presencia de agentes contaminantes se indica con + y ausencia de los mismos con -.

- Callos no desarrollados se indica con - ; callos muy poco desarrollados con + y callos bastante desarrollados con +++.

La esterilización de la cubierta del fruto de Cedro con alcohol 70% y Benlate 7 gr/l fue suficiente para obtener embriones inmaduros completamente asépticos.

Los callos se desarrollaron en explantes de embriones zigóticos maduros en un medio sólido MS (1962) que contenía 4 mg/l de 2,4-D y en explantes de embriones zigóticos inmaduros cultivados igualmente en un medio sólido MS, que contenía 6 mg/l de 2,4-D, y mantenidos en oscuridad total. Ambos tipos de explantes desarrollaron callos friables de color blanquecino o crema que, al ser subcultivados en un medio fresco sin hormonas, produjeron la misma respuesta morfogénica, desarrollando a la 3 semanas de subcultivo, varias raíces pequeñas con abundantes pelos capilares (Figs. 1 y 2). Las tablas 4 y 5 muestran el efecto de la auxina 2,4-D sobre los explantes de embriones utilizados.

**TABLA 4. EFECTOS DE LA AUXINA 2,4-D SOBRE INDUCCION DE CALLOS Y MORFOGENESIS DE EMBRIONES ZIGOTICOS MADUROS**

Auxina	Concentración mg/l	Formación de callo	Subcultivo (4 semanas después)	Morfogénesis. (Rizogénesis)
2,4-D	2	-	MS (1962)  sin 2,4-D	-
2,4-D	4	+++	MS (1962)  sin 2,4-D	+++

- 2,4-D: 2,4-Acido diclorofenoxiacético

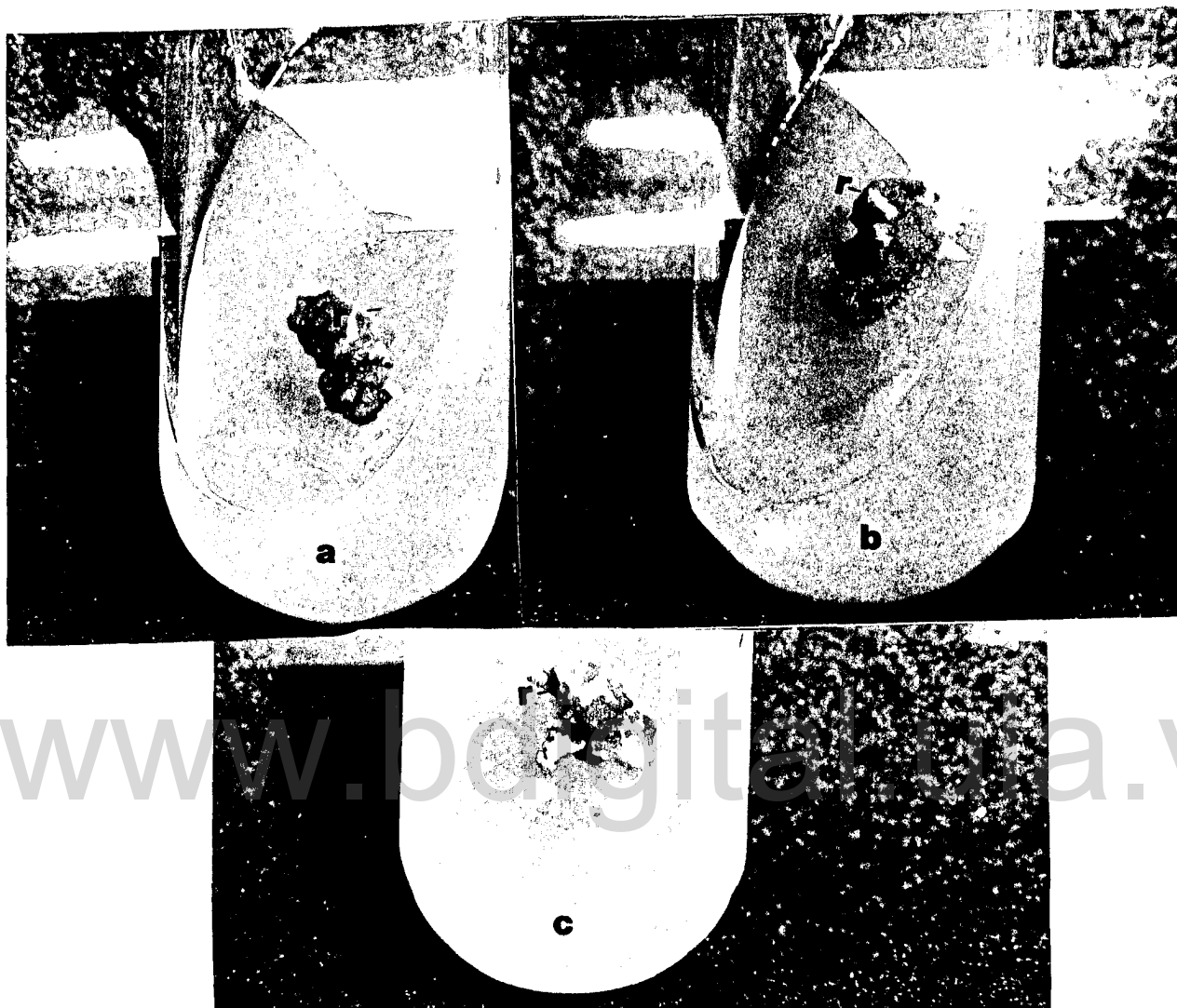
- Formación de callo se indica con +++ y callos ausentes o no desarrollados se indica con -.

- Ausencia de morfogénesis se indica con - y formación de raíces se indica con +++.



**Fig. 1. Callogénesis y rizogénesis a partir de embriones maduros de Cedro.**

- a) Callos de embriones zigóticos maduros mostrando rizogénesis.
- b) Callo friable muy desarrollado.



**Fig. 2. Callogénesis y rizogénesis a partir de embriones inmaduros de Cedro.**

a, b y c) Callos producidos en explantes de embriones inmaduros de Cedro, mostrando rizogénesis.

TABLA 5. INDUCCION DE CALLOS Y MORFOGENESIS A PARTIR DE EMBRIONES INMADUROS

Auxina	Concentración mg/l	Formación de callos	Subcultivo (4 semanas después)	Morfogénesis. (Rizogénesis)
2,4-D	3	+	MS (1962)  sin 2,4-D	+
2,4-D	4	+	MS (1962)  sin 2,4-D	++
2,4-D	6	+++	MS (1962)  sin 2,4-D	+++

- Callos poco desarrollados se indica con +; callos medianamente desarrollados se indica con ++ y callos muy desarrollados se indica con +++.

- Raíces poco desarrolladas se indica con +; raíces desarrolladas pero no vigorosas se indica con ++ y raíces bien desarrolladas se indica con +++.

El subcultivo de estos callos con raíces en un medio MS con una combinación de Tidiazuron (TDZ) y Bencil-Adenina (BA) en concentraciones de 0,20 y 0,5 mg/l y 0,40 y 0,5 mg/l, no produjo ninguna respuesta.

Plántulas de novo se produjeron a partir de explantes de embriones zigóticos inmaduros que fueron inoculados en un medio sólido MS, en donde la concentración de AIB fue de 0,05 mg/l y la concentración de TDZ fue de 0,10 mg/l con fotoperíodo de 16/8 h. A los tres días de cultivados los explantes, la zona seccionada del hipocotilo se alargaba, al mismo tiempo que los

cotiledones tomaban una coloración verdosa que se iba intensificando en la medida en que se producía el alargamiento. Una semana después se observó la formación del vástago, mientras que en la zona del hipocotilo se formó un callo de color blanco a partir del cual se produjo un sistema radicular bien diferenciado con muy buen desarrollo (Tabla 6, Fig. 3) Estas plántulas continuaron un desarrollo normal y totalmente libres de agentes contaminantes hasta el momento de su transferencia al invernadero donde su sobrevivencia fue del 100%.

Los explantes de embriones zigóticos inmaduros cultivados en un medio MS que contenía una concentración de AIB 0,20 mg/l y TDZ 0,10 mg/l así como los cultivados en un medio MS con una concentración de AIB de 0,20 mg/l y TDZ de 0,40 mg/l, ambos con fotoperíodo de 16/8 h., tuvieron una respuesta similar a los anteriores pero no desarrollaron raíces. Los callos escindidos y subcultivados en un medio fresco sin hormonas no produjeron ninguna respuesta.

Los vástagos provenientes de aquellos explantes que habían sido cultivados inicialmente en un medio sólido con 0,10 mg/l de TDZ y 0,20 mg/l de AIB produjeron un sistema radicular fuerte que permitió el buen desarrollo de las plántulas con el mismo resultado logrado con las primeras (Tabla 7, Fig 4).

Algunos de estos vástagos produjeron uno o dos brotes adicionales, los cuales fueron seccionados y subcultivados en el medio sólido sin hormonas donde también desarrollaron raíces con un crecimiento favorable para las plántulas (Fig. 5).

Los vástagos producidos a partir de explantes cultivados en un medio que contenía 0,20 mg/l de TDZ y 0,40 mg/l de AIB produjeron callo nuevamente en la zona alargada del hipocotilo; pero no se observó crecimiento en estos vástagos.

TABLA 6. FORMACION DE PLANTAS A PARTIR DE EXPLANTES DE EMBRIONES INMADUROS

N Explantes	Citocinina + Auxina	Concentración mg/l	% Plántulas	Vástagos
45	TDZ	0,10	95	-
	AIB	0,05		
45	TDZ	0,20	0	95%
	AIB	0,10		
45	TDZ	0,40	0	90%
	AIB	0,20		

TDZ: Tidiazuron.

AIB: Acido indolbutírico

TABLA 7. SUBCULTIVO Y ENRAIZAMIENTO DE VASTAGOS OBTENIDOS A PARTIR DE EMBRIONES INMADUROS TRATADOS CON TDZ + AIB

N Vástagos	Medio	% Enraizamiento
45	MS (1962)	90
45	MS (1962)	0

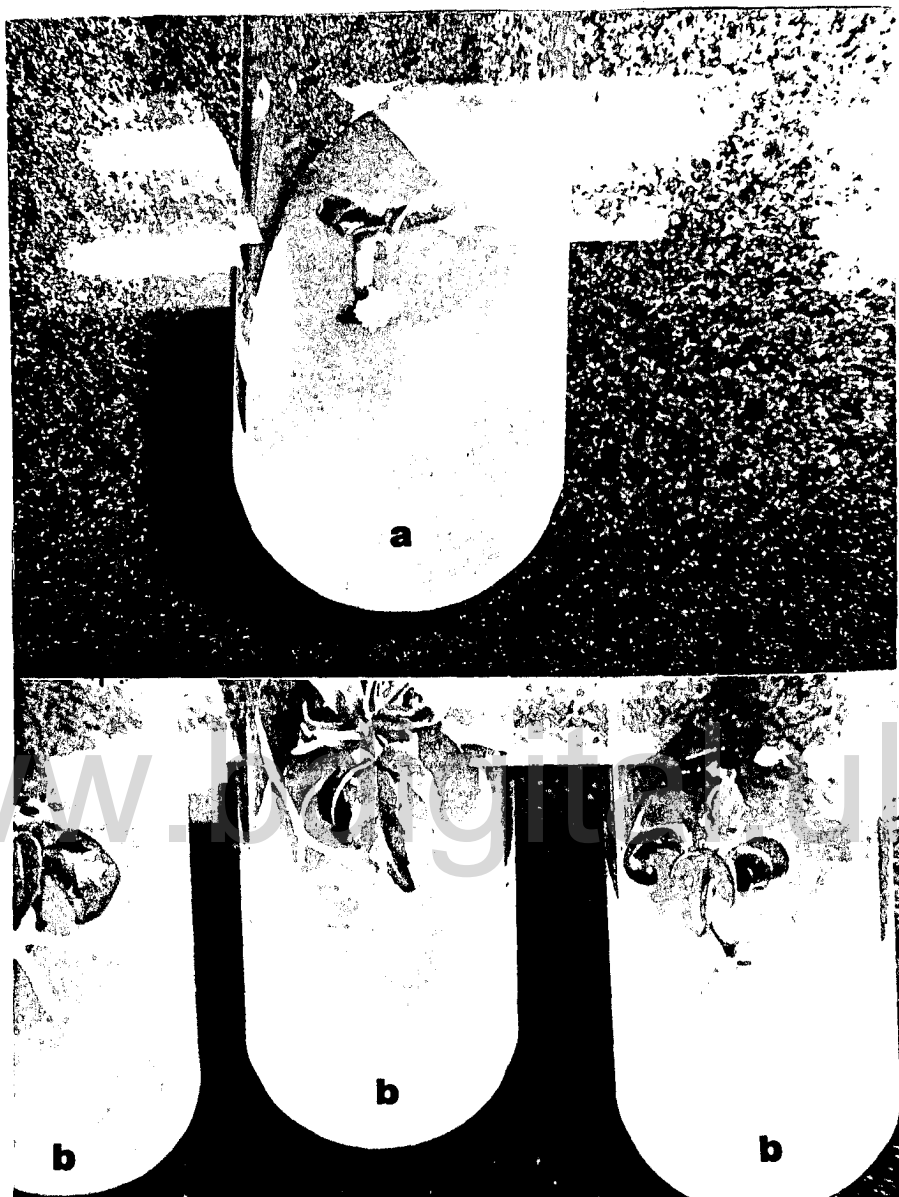


Fig. 3. Neoregeneración de brotes a partir de embriones inmaduros de Cedro.

a y b) Plantas de novo producidas en AIB 0,05 mg/l y TDZ 0,10 mg/l.

c) Detalle del desarrollo de la raíz.





**Fig. 4. Vástagos de Cedro enraizados.**

- a) Vástagos producidos en MS (1962) con AIB 0,20 mg/l y TI<sub>2</sub>Z 0,4 mg/l, mostrando un callo en la base.
- b) Vástagos producidos en MS (1962) con AIB 0,10 mg/l y TI<sub>2</sub>Z 0,20 mg/l.



**Fig. 5. Inducción de yemas adventicias de Cedro en embriones inmaduros.**

- a) Varios vástagos producidos en un medio sin hormonas.
- b) Vástago transferido y enraizado en un medio fresco.



Fig. 6. Plántulas de Cedro en diferentes estadios, creciendo en vermiculita estéril.

Los ápices de Cedro escindidos de las plantas a partir de semillas germinadas **in vitro** y cultivados en un medio líquido MS/2 con un régimen de luz tenue indirecta se mantuvieron verdes y creciendo lentamente durante tres semanas a partir de las cuales los explantes comenzaron a tomar una coloración marrón, que al intensificarse produjo la muerte de éstos.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## VI. DISCUSION

### 6.1 METODO DE ESTERILIZACION

El cultivo de plantas leñosas *in vitro*, por lo general es considerado más difícil que el cultivo de plantas herbáceas debido, entre otros aspectos al fracaso en la aplicación de técnicas de esterilización adecuadas para producir cultivos axénicos, es decir, libres de agentes patógenos (Young et al., 1984). Hongos, levadura y bacterias pueden ser introducidas en los cultivos *in vitro* con el material vegetal, si la esterilización superficial es ineficiente. Explantes tomados de tejidos vegetales expuestos o que se encuentran cerca del suelo, plantas creciendo en el campo en climas tropicales y plantas excesivamente regadas, son más difíciles y algunas veces hasta imposible de ser esterilizadas (Leifert and Waites, 1990).

Al ensayar los métodos de esterilización superficial en semillas, embriones (maduros e inmaduros) y yemas apicales de Cedro, los explantes que presentaron mayores problemas de contaminación, especialmente por bacterias, fueron los embriones zigóticos maduros. La aplicación de un método combinado de desinfección utilizando hipoclorito de sodio, seguido de la esterilización con un antibiótico, (ampicilina), permitió la eliminación de estos organismos.

Bonga and Von Aderkas (1992) señalan que para tejidos que no están envueltos por una cubierta protectora, el hipoclorito de sodio o de calcio es el esterilizante más utilizado, sin embargo, agregan que cuando los métodos tradicionales de esterilización no resultan efectivos, la desinfección puede ser mejorada con fungicidas y bactericidas.

Esta observación coincide con lo ocurrido en la esterilización de los explantes de semillas y embriones zigóticos maduros de Cedro. La utilización de hipoclorito de sodio al 4,25% y 2 gotas del surfactante tween 20 con esterilización al vacío por 15 minutos produjo una desinfección óptima de las semillas como puede verse en la Tabla 1. En los embriones

zigóticos maduros (carentes de cubierta protectora), el principal causante de contaminación lo constituyeron las bacterias. Estos embriones sometidos a un tratamiento esterilizante similar al descrito para las semillas no respondieron satisfactoriamente. La aparición sistemática de bacterias en los embriones maduros de Cedro, condujo a la utilización de un antibiótico, (ampicilina), cuyas características de poseer un amplio espectro de acción y ser bactericida lo hizo apto para su escogencia. Falkiner (1990) señala que, en vista de la extensa gama de posibles contaminantes, el agente (antibiótico) escogido debe tener un amplio rango de actividad y ser bactericida; pero es claramente esencial que la droga no tenga efectos colaterales en el tejido de la planta. Los resultados obtenidos después de la aplicación del antibiótico (Tabla 2) demuestran que una dosis de 50 mg/l de ampicilina fue efectivo para la eliminación de los agentes contaminantes y no es tóxico para los mismos. Por otro lado, la obtención de explantes de embriones inmaduros completamente asépticos muestra que la cubierta protectora del fruto actúa como una barrera impermeable muy efectiva contra los microorganismos y en consecuencia, asegura el mantenimiento de un ambiente estéril a los embriones inmaduros que contribuyó en la obtención de explantes axénicos durante el cultivo y subsiguientes subcultivos de vástagos y plantas obtenidos.

La aplicación de hipoclorito de sodio también fue efectiva en la eliminación de hongos en explantes de ápices y yemas con entrenudo de otra especie de Cedro *Cedrela tonduzii* (Guevara et al., 1994). La aplicación de antibióticos para la eliminación de bacterias ha sido probada con éxito en otras especies leñosas. Bacterias en cultivos de vástagos de *Malus*, *Rhododendron* y *Pseudotsuga meziensis* fueron eliminadas mediante la aplicación de una combinación de cefotaxina, tetraciclina, rifampicina y polimixina-B (Young et al., 1984).

La combinación de Cloruro de Mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) con ampicilina fue igualmente efectiva para desinfectar los explantes de yemas apicales de Cedro, las cuales se mantuvieron libres de contaminación durante todo el tiempo de observación.

El Cloruro de Mercurio ha sido efectivo en la esterilización de los vástagos de varias especies de latifoliadas (Chalupa, 1987). El Cloruro de Mercurio fue más efectivo en la desinfección de ápices de *Populus* que el hipoclorito de sodio o el peróxido de hidrógeno (Bonga and Von Aderkas, 1992).

## 6.2 PRODUCCION in vitro DE PLANTAS FUENTE

Uno de los aspectos más resaltantes de la germinación de las semillas de *C. odorata* **in vitro** fue el período de germinación; mientras en condiciones naturales, estas semillas tienen un período de germinación de 2 - 4 semanas (Lamb, 1969; Lamprecht, 1990) en condiciones **in vitro** el período de germinación se reduce a una semana. Por otro lado, es importante señalar la alta tasa de germinación y la baja tasa de mortalidad, dos aspectos muy importantes que influyen en el éxito de la aclimatación de las plántulas a las condiciones de invernadero.

## 6.3 PROPAGACION INDIRECTA

### 6.3.1 Inducción de callos

La inducción de callos se produjo a partir de explantes de embriones zigóticos maduros y embriones zigóticos inmaduros. La respuesta de ambos explantes fue similar en cuanto al tipo de callo producido y la formación de raíces, una vez subcultivados los callos en un medio fresco sin hormonas. La diferencia observada fue en cuanto a los requerimientos en la concentración de la fitohormona. El mejor desarrollo de los explantes de embriones maduros se observó en un medio sólido MS (1962) con 4 mg/l de 2,4-D mientras que los embriones zigóticos inmaduros tuvieron una mejor respuesta en un medio similar al anterior suplementado con 6 mg/l de 2,4-D.

Las auxinas no son cuantitativa o cualitativamente iguales en cuanto a su acción, las fenoxiauxinas como el 2,4-D son fuertes promotoras de la inducción de callos, crecimiento y

crecimiento de células en suspensión. Existen sólo unos pocos ejemplos de inducción de vástagos y raíces mediante fenoxiauxinas en cultivo de tejidos de árboles (Minocha, 1987). Es interesante señalar que los embriones de Cedro respondieron positivamente a la inducción de callos mediante 2,4-D, promoviéndose además la formación de raíces sobre estos callos subcultivados en un medio fresco sin 2,4-D, esto parece indicar que, al menos en los explantes aquí tratados el 2,4-D estimula la morfogénesis.

El 2,4-D combinado con TDZ fue utilizado para inducir la formación de callos en explantes de yemas apicales y laterales, segmentos nodales, hojas y cotiledones de Caoba, cultivados en un medio básico WPM (Medio para plantas leñosas) a concentraciones de 0,02 - 0,04 mg/l y 2 - 5 mg/l de 2,4-D, lográndose la formación de callos en segmentos nodales, discos foliares y porciones de cotiledones, sin embargo, no se observó morfogénesis en este caso (Albarran, 1995). Mayores concentraciones de 2,4-D fueron utilizados para inducir embriogénesis somática en explantes de embriones zigóticos maduros de *Ocotea catharinensis*, cultivados en un medio WPM a media concentración, lográndose resultados óptimos (Moura-Costa, 1993).

Estos resultados son interesantes porque las diferentes respuestas obtenidas pudieran interpretarse como debidas a la interacción de varios factores: el genotipo, el medio básico nutritivo utilizado, la concentración de la fitohormona y las características del explante seleccionado.

Ahuja (1983), citado por Von Aderkas (1993) señala, por otro lado, que los antibióticos pueden tener efectos morfogénicos y algunas veces podrían estimular la formación de raíces. Este no sería el caso en los explantes de embriones de Cedro ya que si bien, se utilizó un antibiótico en el proceso de desinfección de los embriones zigóticos maduros, los embriones zigóticos inmaduros no recibieron el mismo tratamiento y sin embargo ambos tipos de explantes produjeron una respuesta similar.



## 6.4 PROPAGACION DIRECTA

### 6.4.1 Obtención de plantas fuente de novo a partir de embriones maduros de *C. odorata* L.

La formación de múltiples yemas, deseable para la propagación clonal, es estimulado añadiendo al medio básico altas concentraciones de citocininas (Dodds and Roberts, 1982). Las citocininas más comúnmente empleadas son BA (Bencil-adenina), K (Kinetina), 2-iP (6-dimetil-alil-aminopurina) y zeatina; siendo estas dos últimas, citocininas naturales. De estas BA (Bencil-Adenina) es la más activa, económica y la única que puede ser sometida a la autoclave (Bonga and Von Aderkas, 1992). Últimamente varias citocininas sintéticas, diferentes a BA están siendo probadas. La más conocida de estas es el TDZ (Tidiazuron). Este compuesto es un herbicida derivado de fenilúrea el cual promueve la biosíntesis (o inhibe la descomposición) de citocininas endógenos o purinas (Thomas and Katerman, 1986) y causa una reducción en el nivel endógeno de ABA (Ji and Wang, 1988 citado por Bonga and Von Aderkas, 1992).

Un aspecto relevante de este trabajo fue el efecto de los reguladores de crecimiento sobre los explantes de embriones zigóticos inmaduros de Cedro, donde las diferentes respuestas obtenidas dependieron fundamentalmente de las concentraciones utilizadas. La mejor respuesta se obtuvo a partir de explantes cultivados en un medio MS (1962) suplementado con AIB 0,05 mg/l y TDZ 0,10 mg/l, con fotoperíodo 16/8 horas, donde se generaron plantas completas de novo a partir de vástagos enraizados en el mismo medio, mientras que las concentraciones más altas utilizadas, produjeron un efecto inhibitorio en la formación de la raíz y un pobre desarrollo de los vástagos generados en este medio.

Sin embargo, es interesante destacar el enraizamiento de vástagos y la proliferación en algunos de ellos de más de una yema, en aquellos vástagos generados a partir de embriones zigóticos inmaduros, transferidos desde un medio que contenía una concentración de AIB 0,10

mg/l y TDZ 0,20 mg/l. Este resultado es consistente con la observación de que la remoción de las auxinas del medio induce el enraizamiento y a la formación y crecimiento de yemas adventicias señaladas por Minocha (1987). Por otro lado, este resultado, aunque poco aparente puede ser indicador de que los embriones zigóticos inmaduros de Cedro podrían ser inducidos a formar múltiples yemas adventicias, si se utilizan una combinación de auxinas y citocininas en concentraciones adecuadas.

Las diferentes respuestas logradas sugieren una interacción efectiva entre el explante escogido y los reguladores de crecimiento utilizados. El Tidiazuron ha sido utilizado en combinación con AIB para estimular la proliferación de yemas adventicias en otras plantas leñosas. Navarrete et al. (1984) citada por Bates (1992) encontró TDZ combinado con BA en un medio MS (1962) estimuló la formación de yemas adventicias axilares en fresno, produciéndose la mayor proliferación de yemas en un medio con 3  $\mu\text{M}$  TDZ, 1  $\mu\text{M}$  BA y 1  $\mu\text{M}$  AIB. Los microvástagos fueron enraizados fácilmente *in vitro* en MS/4 conteniendo 5  $\mu\text{M}$  AIB y 5  $\mu\text{M}$  ANA. TDZ también fue efectivo para inducir múltiples yemas adventicias a partir de explantes de embriones inmaduros de *Fraxinus americana* (Fresno), los cuales fueron fácilmente enraizados en un medio MS (1962) con 0,1 mg/l de AIB (Contreras y Olivo, 1993).

La escogencia de explante también juega un papel importante en el grado de respuesta obtenida, Bonga and Von Aderkas (1992) señalan al respecto que un importante aspecto en la micropropagación de árboles maduros recalcitrantes es la escogencia del explante. En muchos casos sólo unos pocos tejidos darán la respuesta deseada y que una vez que se ha identificado el tipo de explante con la mayor capacidad morfogénica, se pueden iniciar experimentos para optimizar la respuesta deseada. Ahuja (1993) señala por otro lado, que en plantas leñosas, los tejidos juveniles tales como brotes de troncos, brotes de árboles podados, embriones zigóticos o partes de plántulas (epicotilos, hipocotilos y cotiledones) son los mejores explantes si lo que se quiere lograr es la regeneración de plantas. En este sentido, los embriones zigóticos inmaduros, si bien no produjeron múltiples yemas adventicias, mostraron una gran capacidad morfogénica

que los hace aptos como explantes con un gran potencial para ser inducidos a producir múltiples yemas adventicias.

#### 6.4.2 Cultivo de yemas apicales de cedro

La oxidación de los explantes de yemas apicales de Cedro, a consecuencia de la exudación de sustancias fenólicas se cree que fue la principal causa del fracaso en la obtención de una respuesta exitosa en este tipo de explantes.

El establecimiento de explantes frecuentemente requiere procedimientos especiales para escapar o evitar problemas que están asociados con la exudación. Con muchas especies (especialmente plantas leñosas) el medio se oscurece en minutos, horas o días, o se produce después de la transferencia inicial de los explantes, el problema de la oxidación por lo general es más severo cuando los tejidos son escindidos de plantas leñosas que de plantas herbáceas (Compton and Preece, 1986). La oxidación de fenoles es una de las causas más comunes del fracaso en el establecimiento de cultivos *in vitro* de plantas leñosas. En Teca el problema de los fenoles se presenta durante el establecimiento de yemas y proliferación de vástagos en los subcultivos iniciales (Mascarenhas, 1987).

El cultivo de segmentos nodales de *Swietenia macrophylla* no produjo respuestas debido a la oxidación del 50% de los explantes cultivados, los cuales murieron (Lee and Rao, 1988).

Sin embargo, es importante destacar que las yemas escindidas de plantas de Cedro se mantuvieron verdes y creciendo durante un período de 3 semanas a partir del cual comenzó a observarse la oxidación de los explantes. Esto parece indicar que la utilización de antioxidantes en el momento de la escisión del explante de la planta fuente, sumergiendo los mismos en una solución de agua destilada con ácido cítrico 150 ppm y ácido ascórbico 100 ppm y el uso de PVP (Polvinilpolipirrolidona) durante el proceso del cultivo de los explantes fue efectivo al menos

en la etapa inicial del establecimiento del cultivo. El uso de antioxidantes es un método que ha sido usado en el control de la exudación. PVP es un polímero fuerte, receptor de hidrógenos; pero no puede actuar como donador de hidrógenos. Este compuesto absorbe fenoles e inhibe la catecoloxidasa (una oxidasa de polifenoles). Así PVP sólo puede ser efectivo con especies seleccionadas (Compton and Preece, 1986). Se ha observado que la transferencia de los explantes también puede ayudar a minimizar los efectos de la oxidación en el medio. Compton y Preece, (1986) señalan que un método rápido para incrementar la supervivencia de los explantes es la transferencia rápida de los explantes a un medio fresco. En este sentido sería interesante seguir ensayando con explantes de yemas apicales de Cedro, con el objeto de optimizar los métodos de cultivo de los mismos.

#### 6.5 ACLIMATACIÓN DE PLANTAS PRODUCIDAS IN VITRO AL AMBIENTE DE INVERNADERO

Las plantas obtenidas a partir de semillas de Cedro germinadas *in vitro* se aclimataron perfectamente a las condiciones de invernadero sin sufrir los efectos que un cambio de ambiente puede producir en las plantas. La sobrevivencia y desarrollo normal exhibido por estas plantas indican que las plantas de Cedro son menos susceptibles a sufrir los problemas de aclimatación que se presentan en otras especies como son la falta de suficiente cubierta epicutular, pobre funcionamiento de los estomas entre otros que se han observado por ejemplo en *Leucaena leucocephala*, *Liquidambar styraciflua*, *Prunus cerasus* y *Malus pumila* (Bonga and Von Aderkas, 1992). El mismo resultado fue observado en aquellas plantas generadas *de novo* a partir de explantes inmaduros de Cedro. Aunque su permanencia en condiciones asépticas fue más prolongada su adaptación a las condiciones de invernadero fue igualmente efectiva. Lee y Rao, (1988) señalan que para que las técnicas *in vitro* para ser adaptadas de manera efectiva se requiere que las plantas producidas sean saludables de manera que se pueda asegurar una alta tasa de sobrevivencia de plantas de calidad para ser transferidas y atribuyen la baja tasa de sobrevivencia de las plantas de Caoba (20%) a un pobre desarrollo de la raíz.

En este sentido es interesante destacar el desarrollo vigoroso de las raíces de las plantas de Cedro regeneradas **in vitro**, a lo que podría atribuirse la alta tasa de sobrevivencia (100%) y su exitosa aclimatación a las condiciones **ex vitro**.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## VII. CONCLUSIONES

*Cedrela odorata* L. es una especie que responde positivamente a la regeneración **in vitro**, al menos en lo que se refiere al cultivo de explantes de embriones ya sean estos maduros o inmaduros.

La utilización de un método de esterilización adecuado permitió eliminar en un alto porcentaje la contaminación de bacterias en los embriones maduros de Cedro, en los cuales la cubierta de la semilla no resulta tan efectiva en la protección del tejido del embrión contra los agentes contaminantes.

La capacidad morfogénica de los explantes de embriones de Cedro quedó demostrada en la formación de raíces tanto en los callos formados indistintamente a partir de explantes de embriones inmaduros como de explantes de embriones maduros así como en la facilidad de enraizamiento de los vástagos producidos a partir de explantes de embriones inmaduros. Sin embargo, la organogénesis directa es más fácil de inducir en este tipo de explantes. Esta capacidad morfogénica puede ser un incentivo para la adaptación de otros métodos de cultivo tales como cultivos de protoplastos y células en suspensión.

A pesar de que no hubo diferencias en cuanto al comportamiento de ambos tipos de explantes, los embriones inmaduros resultaron los explantes que ofrecieron los mejores resultados por su condición de asepsia y por su respuesta morfogénica a los medios utilizados.

La alta tasa de sobrevivencia de las plantas originadas a través de cultivos **in vitro** debida a una efectiva aclimatación a las condiciones **ex vitro** proporciona una sólida base para iniciar ensayos de comportamiento en el campo y establecer métodos de micropropagación de esta especie.

La formación de varias yemas adventicias en algunos explantes de embriones inmaduros de Cedro, sugiere la capacidad potencial de estos explantes para producir múltiples yemas adventicias y podría ser empleada para promover una alta tasa de multiplicación en el Cedro.

Los resultados obtenidos con *C. odorata* son alentadores, sin embargo es necesario continuar la investigación iniciada a fin de desarrollar métodos más efectivos para la inducción de aquellos procesos que favorezcan la micropropagación de esta especie.

www.bdigital.ula.ve

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AHUJA, M. R., 1987. *In Vitro* Propagation of *Poplar* and *Aspen*. In Bonga, J. M. and Don J. Durzan (Eds.): Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. 3. Dordrecht. 207-223 pp.
- AHUJA, M. R., 1993. Micropropagation *à la carte*. In Ahuja, M. R. (Ed.): Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam. 3-9 p.
- ALBARRAN, R. S. G., 1995. Estudio de Condiciones Optimas para la Regeneración *in vitro* y la Transformación Genética de *Swietenia macrophylla* King. (Caoba). Trabajo especial de Grado. Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida (Venezuela). 99 p.
- ARISTEGUIETA, L., 1973. Familias y Géneros de los Arboles de Venezuela. Instituto Botánico. Caracas, Venezuela. 845 p.
- BATES, S.; PREECE, J. E.; NAVARRETE, N. E.; VAN SAMBEEK, J. W.; & GAFFNEY, G. R., 1992. Thidiazuron stimulates shoot organogenesis and somatic embryogenesis in white ash (*Fraxinus americana* L.). Plant. Tiss. Org. Cult. 31: 21-29.
- BONGA, J. M. y P. Von ADERKAS, 1992. *In Vitro* Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 236 p.
- BOULAY, M., 1987. Conifers Micropropagation: Applied research and Commercial aspects. In Bonga, J. M. and Don J. Durzan (Eds.): Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. 3. Dordrecht. 185-206 pp.
- BURDON, R. D., 1995. Contribución de la Biotecnología a la mejora Genética de los Arboles Forestales. Recursos Genéticos. FAO, Roma 22: 2-4.
- CHALUPA, V., 1987. European Hardwoods. In Bonga, J. M. and Don J. Durzan (Eds.): Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. 3. Dordrecht. 224-240 pp.
- CHRISTIANSON, M. L. y D. A. WARNICK, 1983. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. Develop. Biol. 95: 288-293.
- COMPTON, E. y PREECE, J. E., 1986. Exudation and explant establishment. Plant. Sci. Lett. 50: 9-18.



- CONTRERAS, I. y L. VALERA (a), 1988. Micropropagación de *Eucalyptus globulus* a través de cultivos *in vitro*. IX Congreso Venezolano de Botánica. Resúmenes. Jardín Botánico de Caracas. Caracas, Venezuela.
- CONTRERAS, I. y L. VALERA (b), 1988. Micropropagación de *Pinus caribaea* var., *hondurensis* y *Pinus oocarpa* *in vitro*. IX Congreso Venezolano de Botánica. Resúmenes. Jardín Botánico de Caracas. Caracas, Venezuela.
- CONTRERAS, I. y L. VALERA, 1992. Propagación Clonal rápida de *Pinus caribaea* ver., *hondurensis* y *Eucalyptus grandis*. Etnobotánica. Resúmenes. Córdoba, España, p: 426.
- CONTRERAS, I. y R. BUSTAMANTE, 1992. Propagación Clonal de *Morus insignis* y *M. multicaulis* a partir de yemas laterales y obtención de plantas *de novo* a partir de lámina foliar. Etnobotánica. Resúmenes. Córdoba, España, p: 426.
- CONTRERAS, I. y N. OLIVO., 1993. Cultivo *in vitro* de *Fraxinus americana* L. (Fresno). XLII Convención Anual de AsoVac. Resúmenes. Acta Científica Venezolana. 44 p.
- DODDS, S. and LORIN, R. W., 1982. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. Cambridge, New York. 178 p.
- ENRIQUEZ DEL VALLE, J. R., 1985. Propagación *in vitro* de Cedro rojo (*Cedrela odorata* L.). Tesis VACH, Chapingo. México. 93 p.
- FALKINER, F. R., 1990. The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. Newsletter 60: 13-23.
- FINOL, H. y G. MELCHIOR, 1970. Unos Apuntes sobre Conservación de Reservorios de Genes de especies forestales Indígenas de actual valor comercial. Rev. For. Vlana. Mérida, Venezuela. Año XII, Nos. 19-20: 73-90.
- GONZALEZ, A.; C., MARTÍNEZ; R. SILVA.; E, GODOY e I. CONTRERAS, 1993. Micropropagación de *Leucaena leucocephala* (Lamb) de Wit. XLIII Convención Anual de AsoVac. Resúmenes. Acta Científica Venezolana. Facultad de Ciencias. ULA, Mérida, Venezuela. p: 39.
- GUEVARA, M. G., 1988. Experiencias Colombianas con Cedro (*Cedrela odorata* L.). CONIF, Serie Documentación. Bogotá, Colombia. 86 p.
- GUEVARA, B. N.; HIDALGO y O. MURILLO, 1992. Cultivo *in vitro* de Cedro dulce (*Cedrela tonduzii*). San José. Costa Rica. Tecnología en Marcha, 11: 10-16.

- GUPTA, P. K. y A. F. MASCARENHAS, 1987. *Eucalyptus*. In Bonga, J. M. and Don J. Durzan (Eds.): Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. 3. Dordrecht. 385- 410 p.
- GUPTA, P. K.; A. L. NADGIR; A. F. MASCARENHAS y V. JAGANNATHAN, 1980. Tissue Culture of Forest Trees: Clonal Multiplication of *Tectona grandis* L. (Teak) By Tissue Culture. Plant. Sci. Lett., 17: 259-269.
- HAINES, J. R., 1994. La Biotecnología en el mejoramiento de especies forestales: Tendencias y prioridades de la investigación. Unasylva 177.
- LAHERA, W., A. ALVAREZ y S. GAMEZ, 1995. Estado del Programa de Mejoramiento Genético de *Cedrela odorata* L. desarrollado en Cuba. Recursos Genéticos Forestales. FAO, Roma 22: 27-28.
- LAKSMI SITA, G., 1993. Micropropagation of nitrogen-fixing trees: In: M. R. AHUSA (Ed.). Micropropagation of Woody Plants. Klumer, Academic Publishers, Netherlands. 303-315 p.
- LAMB, A. F. A., 1969. Especies Maderables de Crecimiento Rápido en la Tierra Baja Tropical, *Cedrela odorata*. IFLAIC. Bull. Mérida, Venezuela. 30-31: 15-59.
- LAMPRECHT, H., 1990. Silvicultura de los Trópicos. Instituto de Silvicultura de la Universidad de Gottingen, República Federal de Alemania. 260-265 p.
- LEE, S. K. y A. N. RAO, 1988. Plantlet Production of *Swietenia macrophylla* King. Trough Tissue Culture. Gard. Bull. Sing. 41: 11-18.
- LEIFERT, C. y W. M. WAITES, 1990. Contaminants of plant tissue cultures. Newsletter 60: 2-13.
- MASCARENHAS, A. F.; S. V. KENDURKAR; P. K. GUPTA; S. S. KHUSPE y D. C. AGRWAK, 1987. Teak. In Bonga, J. M. and Don J. Durzan (Eds.): Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. 3. Dordrecht. 300-337 p.
- MASCARENHAS, A. F.; SHUCHISWETA, V. K. y SURVAKANTS, K., 1993. Micropropagation of teak In: M. R. AHUJA (Ed.). Micropropagation of Woody Plants. 247-258 pp.
- MELCHIOR, G. y QUIJADA, M., 1972. Notas Técnicas sobre el comportamiento de unas procedencias de *Cedrela odorata* L. con una de *Cedrela angustifolia* nativa y plantadas como "stumps" en condiciones de vivero. IFLAIC. Bull. 41-42: 57-62. Mérida, Venezuela.

- MINOCHA, S. C., 1987. Plant growth regulators and morphogenesis in cell tissue culture of forest trees. In: Bonga, J. M. y Don J. Durzan (Eds). Cell and Tissue Culture in Forestry. General Principals and Biotecnology. Martinus Nijhoff Publishers. 51-53 p.
- MOURA-COSTA, P. M.; A. M. VIANA y S. H. MANTELL, 1993. *In vitro* Plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis* an endangered Brazilian hardwood forest tree. Plant. Cell. Tiss. Org. Cult. 35: 279- 286.
- MURASHIGE, T., 1978. Principles of rapid propagation In: Propagation of Higher Plants through tissue culture. University of Tennessee, Knoxville, USA. 14-43 p.
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant. Physiol. 15: 437-497.
- OREA, C. D. y V. M. VILLALOBOS, 1985. Micropropagación de especies forestales En: Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. México, DF. 107-111 p.
- PARANJHOTY, K.; S. SAXENA; M. BANERJEE; B. S. JAISWAL y S. BHOJWANI. 1990. Clonal Multiplication of Woody Perennials. In S. S. Bhojwani (Ed.): Plant Tissue and Culture: Applications and Limitations. Elsevier, Amsterdam. 190-219 p.
- RODRIGUEZ, G. F., 1980. Situación concreta de las investigaciones realizadas sobre *Hypsipyla grandella* Zeller en el Sureste de México. Ciencia Forestal, 5 (28): 17-23.
- ROOVERS, M., 1971. Observaciones sobre el ciclo de vida de *Hypsipyla grandella*. IFLAIC. Bull. 38: 3-46. Mérida, Venezuela.
- THOMAS, J. C. y KATTERMAN, F. R., 1986. Citokinina activity induced by thidiazuron. Plant. Physiol. 81: 681-683.
- TREVOR, A. T. y PRAKASH, P. K., 1993. Cellular control of morphogenesis In: Ahuja, M. R. (Ed.), Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 11-29 p.
- VALERA, L., 1990. Propagación de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* a través de técnicas de cultivos *in vitro*. Tesis Magister Scientiae (MSc.). Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- VIBHA, D., 1993. Micropropagation of nitrogen-fixing trees: In: M. R. AHUJA (Ed.), Micropropagation of Woody Plants. Kluwer, Academic Publishers, Netherlands. 303-315 p.

- VEILLON, J. P., 1986. *Especies Autóctonas de los Bosques Naturales de Venezuela*. IFLA. Mérida, Venezuela. 200 p.
- VILLALOBOS, A. V. M., 1985. Micropropagación de especies forestales. In: Teobaldo Egenlus P. (Ed.), *Memorias. Reunión Internacional satélite al IX Congreso Forestal Mundial: El estado actual de la Genética del mejoramiento forestal*.
- ZELEDON, R., 1988. Significado de la Nueva Biotecnología para América Latina y el Caribe. Serie Documentos de Programas: IICA (Costa Rica): *La Nueva Biotecnología en Agricultura y Salud* 7: 7-64 p.

www.bdigital.ula.ve

ANEXO

www.bdigital.ula.ve

## 1. Medio Básico de Murashige y Skoog (1962)

Ingredientes	Concentraciones (mg.l <sup>-1</sup> )
$\text{NH}_4(\text{NO}_3)$	1650
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.3
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Myo-inositol	100
Tiamina.HCl	0.1
Sacarosa	30.000

pH

5.7 - 5.8