

METODOLOGÍA DE MICROPROPAGACIÓN DE SEGMENTOS NODALES DE CEDRO (*Cedrela odorata* L.), OBTENIDOS A PARTIR DE SEMILLA SELECCIONADA, ESTABLECIDOS BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO.

María Elena Montes Ayala

Master en Hortofruticultura

Docente Investigadora

INTRODUCCIÓN

► Nuestro país posee pocos estudios detallados sobre domesticación de especies forestales, y los datos existentes son generalmente monográficos, en los que tampoco se profundiza sobre la variabilidad genética de cada especie. Estos estudios son demorosos debido a los largos períodos de vida y gran tamaño de estas especies, y por tanto, el mejoramiento genético resulta complicado, en comparación con los cultivos agrícolas, con los que además se obtienen rendimientos económicos en corto tiempo. Sin embargo, actualmente se está retomando el incentivo a la producción de forestales, debido en parte a que nuestro país, está catalogado con vocación forestal, según los criterios biofísicos y uso potencial del suelo (Cuéllar *et al.*, 2003; República de El Salvador, 2004). Aunado a esto, la crisis con los precios del café ha hecho que los productores se interesen por diversificar sus cultivos y la producción forestal resulta entonces es muy rentable.

La microporpagación ofrece numerosas ventajas con respecto a la propagación masiva de árboles catalogados como élite, acortando de sobre manera los ciclos de reproducción

que en condiciones de campo tomarían años. Por esta situación, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales se ha introducido recientemente una meliácea de gran interés comercial como es el cedro (*Cedrela odorata*).

La investigación consiste en establecer, mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales, material de esta especie, recolectado y certificado por CEDEFOR (Centro de Desarrollo Forestal), para luego ser multiplicado, enraizado y aclimatado según las condiciones más adecuadas. En base a los mejores procedimientos encontrados se procederá a establecer el protocolo de micropropagación más idóneo para nuestras condiciones.

1. PROBLEMA

Desde hace muchos años en nuestro país, la cobertura de los bosques naturales se ha visto reducida por la introducción de los cultivos de café, algodón, caña de azúcar y cría de ganado, utilizando para ello zonas de diversidades biológicas altamente pobladas y fértiles. Actualmente, el área de cobertura de bosques naturales ha bajado al 2% del área del país, considerando que una buena parte

está constituida por los manglares (bosques salados) ubicados en los márgenes de los esteros. Si a esto se añaden plantaciones de café bajo sombra, la cobertura de bosques se incrementaría a un 12% del territorio nacional, y aún así, sería uno de los más bajos del mundo. En esta misma situación, los bosques existentes como sombra del café casi nunca reciben un manejo adecuado porque son utilizados como subproductos (Cuéllar *et al.*, 2003).

La problemática de la deforestación está provocando tanto en nuestro país como a nivel mundial, daños irreparables en los bosques (113 millones de Ha de bosques tropicales deforestados por año), y la desaparición de muchas especies, entre ellas las meliáceas Cedro (*Cedrela odorata* L.) y Caoba (*Swietenia humilis*) (Muñoz, 2003), las cuales son unas especies muy cotizadas por sus usos en construcción, carpintería y ebanistería fina (MAG, 2004). Sin embargo, también existen problemas de propagación de estas meliáceas, por ejemplo su corta área de dispersión de semillas y el ataque del lepidóptero *Hypsipyla grandella* (Zeller).

2. JUSTIFICACIÓN

Se ha trabajado con métodos convencionales para la propagación de especies forestales con potencial comercial, tal como cedro y caoba.

Sin embargo, la mayoría de estos estudios se basan en manejo de campo desde la germinación y las subsiguientes etapas de crecimiento de los árboles, habiéndose encontrado problemas de bajo potencial

germinativo de semilla (de 33000 semillas/Kg de cedro, 9900 se consideran útiles) (Valentín, 2005).

Anteriormente se ha trabajado con métodos convencionales para la propagación de especies forestales con potencial comercial, tal es el caso de cedro y caoba; sin embargo, todos se basan en manejo de campo desde la germinación continuando con las sucesivas etapas de la vida de los árboles, encontrándose problemas de bajo potencial germinativo de semilla. Además, frecuentemente se presentan inconvenientes en cuanto a uniformidad genética y disponibilidad de cantidades de semilla adecuadas para establecer una plantación comercial. (Guevara, 1996/cit. por Orellana, 1997). Otro problema muy importante en el mejoramiento genético de forestales se debe principalmente al largo ciclo de las especies leñosas desde la siembra de la semilla hasta la floración (Roca y Mroginski, 1991). Para el caso, el tiempo de germinación con el método tradicional sucede en un mínimo de 20 días; en cambio, mediante la técnica de cultivos *in vitro* es en un máximo de dos semanas. En la Universidad se cuenta con experiencia previa sobre micropropagación de caoba, estudio culminado en 2007 (en línea: <http://www.unico.edu.sv/investiga/frames/rvr.php?accion=4>). Ese trabajo también fue realizado a partir de semillas germinadas asépticamente y luego se utilizó la región cotiledonar para mayor producción de hipocótilos para iniciar la multiplicación masiva.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Desarrollar una metodología de regeneración de material vegetal de Cedro (*Cedrela odorata* L.) mediante cultivo de microestacas regeneradas a partir de semilla seleccionada.

3.2. Objetivos específicos

- Establecer los cultivos mediante las yemas cotiledonales, a partir de semillas germinadas *in vitro*.
- Establecer comparaciones en fase de multiplicación con material antiguo y nuevo para determinar potencial de vigor.
- Determinar el mayor porcentaje de enraizamiento de las plantas regeneradas y la consiguiente transferencia a las condiciones de endurecimiento *ex-vitro*.

4. METODOLOGÍA

La semilla procedente de CEDEFOR, se escarificó manualmente, la desinfección del explante se hizo con lejía comercial (5.1%) al 50% v/v por 15 min, 3 enjuagues en cámara con agua estéril (Figura 1a y 1b). Una vez desinfectada la semilla, se procedió a la siembra en tubos de ensayo los cuales contenían un medio de agua destilada, 3% sacarosa, 0.65% de agar, y se ajustó a un pH de

5.7, sin reguladores de crecimiento. En cuanto a las condiciones de incubación, fueron oscuridad y alta temperatura (30°C ideal) mientras comienza la germinación (Figura 1c); posteriormente, condiciones normales para el laboratorio de la UNICO, el cual es un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad con 1350 lux de intensidad, con temperaturas entre 25° – 30°C. La alta temperatura es necesaria para lograr la germinación (ideal 30°C). En este caso se pusieron a germinar en condiciones de oscuridad, lo cual no es tan necesario, puesto que este ensayo se realizó simultáneamente con el caoba, solamente en la fase inicial, y se destaparon al mismo tiempo que las plantas de caoba (a los diez días después de la siembra), y en ese momento estaban demasiado elongadas y delgadas, por tanto, la altura no se ha considerado como variable evaluada. La germinación se completó en aproximadamente un mes y medio, por esperar el desarrollo de hojas verdaderas (Figura 1d). En este caso, el medio inicial consistió del medio MS con macro y microsales a la mitad, 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y 2.46 mM de 2-ip (6 -y, y -dimethylamino purina); pH 5.7, a razón de 30 mL por frasco.

Para iniciar el establecimiento, se tomaron explantes del nudo cotiledonar de aproximadamente 2 cm. y se colocaron verticalmente en el medio de cultivo.

El procedimiento que se siguió para aclimatación de las plántulas completas formadas al final de la fase de desarrollo, que estaban en medio WPM, consistió en la aplicación de agua destilada estéril durante las 24 horas anteriores a la siembra en un sustrato

comercial inerte; posteriormente, se lavaron las raíces con agua de chorro y se colocaron en una cámara húmeda cerrada, brindando riegos nebulizados en forma periódica, uno o dos al día, durante las horas de mayor

temperatura para evitar la deshidratación de las vitroplantas (Figura 2). Luego de un mes en estas condiciones se brindó la primera fertilización con Blaukorn granulado a cada planta.

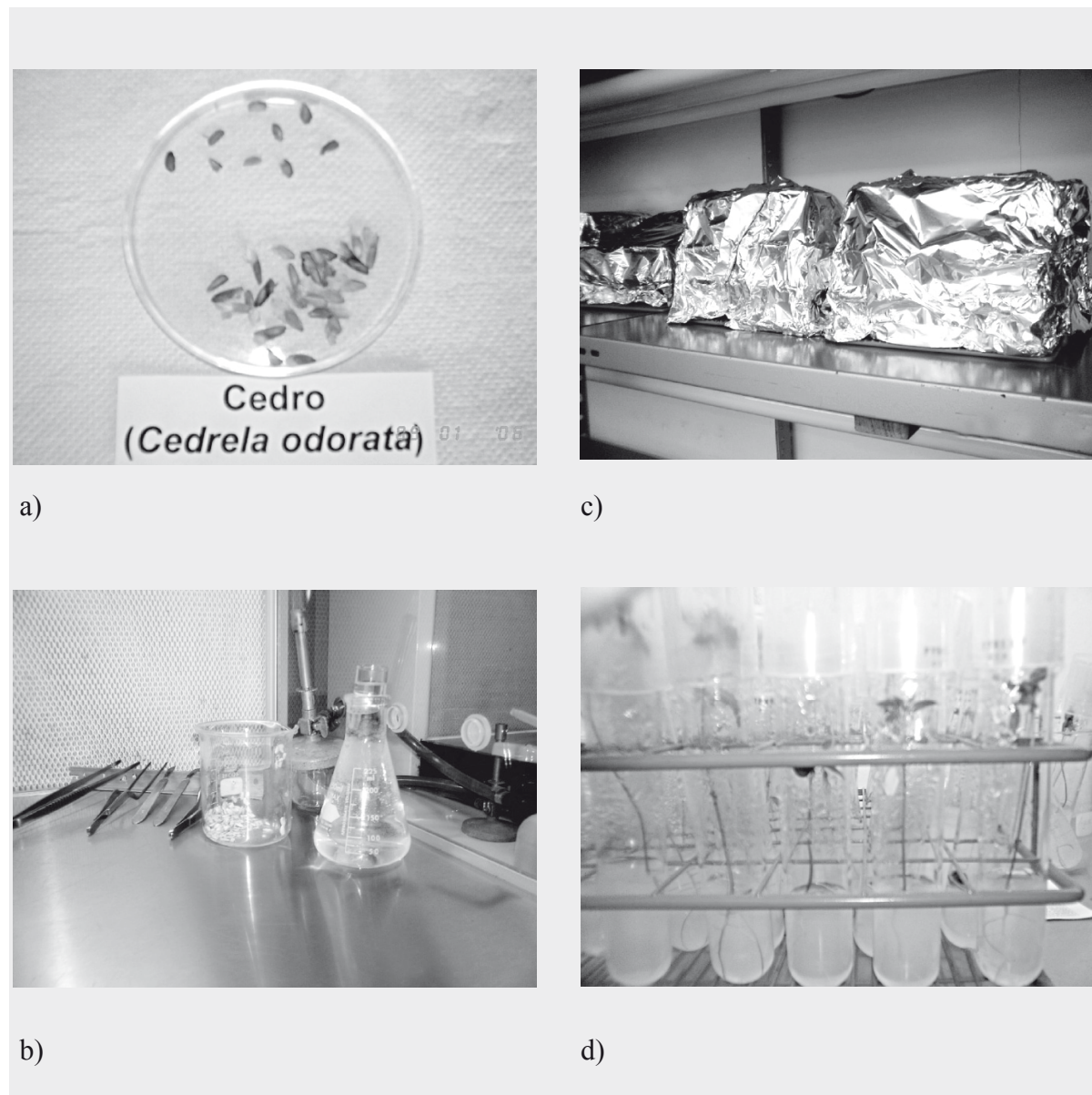


Figura 1. Descripción del proceso de introducción y germinación de semilla de cedro (*Cedrela odorata* L.) al laboratorio de la Universidad Católica de Occidente, la cual proviene de CEDEFOR, 1a) Semilla de cedro con y sin escarificación, 1b) proceso de desinfección de la semilla en cámara de flujo laminar, 1c) frascos tapados con papel aluminio inoculados con las semillas, 1d) semilla de cedro germinada.

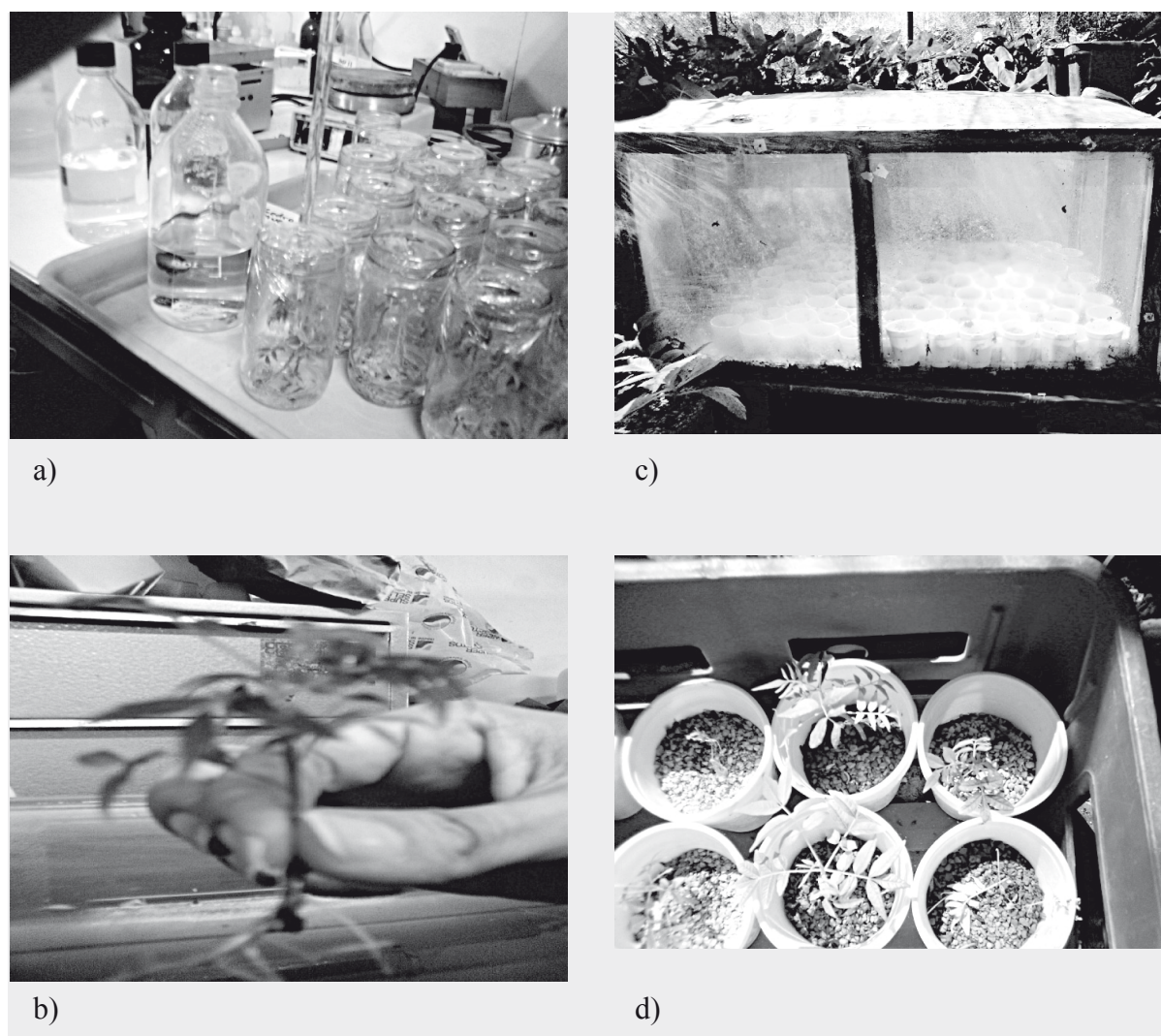


Figura 2. Descripción del proceso de aclimatación de plantas de cedro (*Cedrela odorata* L.) al final de la fase de desarrollo, bajo dos tratamientos, 2a) aplicación de agua destilada estéril a los frascos, 24 horas antes de la aclimatación, 2b) plántula de cedro lista para aclimatación, 2c) cámara cerrada para producir atmósfera húmeda y evitar la deshidratación de las plántulas, 2d) vista de las vitroplantas al salir de la cámara húmeda cerrada.

5. RESULTADOS

Fase de germinación

Luego de un mes y dos semanas se completó la germinación; la aparición del primer

par de hojas verdaderas fue más lento que para caoba; sin embargo, el inicio de la germinación fue simultáneo. El porcentaje de plántulas útiles para corte fue del 84.6 %. El porcentaje de contaminación total fue del 5.8 %, siendo por hongos. Esto se puede atribuir a la asociación de las semillas de especies forestales tropicales con numerosos

microorganismos, que de manera natural ayudan a los procesos de germinación, pero que representan un factor limitante para los trabajos *in vitro* (Castro, 2001/Cit. por Pérez *et. al.*, 2004).

Fase de iniciación (establecimiento)

En este caso no se han realizado comparaciones entre distintos tipos de explantes, ya que según estudios en esta especie (Pérez *et al*, 2004), el explante ideal resulta ser solamente el nudo cotiledonar debido a la estructura de la planta. Por tanto, los análisis estadísticos al respecto serán al final de la fase de multiplicación.

Fase de multiplicación

Al elegir evaluar las dosis de citoquininas BAP y 2 -iP en esta fase, que resultaron óptimas para la multiplicación de cedro (6.5 $\mu\text{M/l}$ y 2.46 $\mu\text{M/l}$, respectivamente), según (Pérez *et al.*, 2004), no se obtuvieron las mismas respuestas (datos no incluidos), por lo que se optó por manejar una dosis de 0.5 mg/l de BAP con medio MS normal, según el manejo en el Instituto Tecnológico de Costa Rica (Abdelnour, 2006); entonces los tratamientos empleados fueron material vegetal antiguo (con multiplicaciones previas) y nuevo (de un mes y medio de germinación). Se realizaron tres ciclos de multiplicación, midiendo las variables de número de brotes por explante y la altura en centímetros de los mismos.

En los tres ciclos de multiplicación evaluados hubo una tendencia general, aunque sin

diferencias estadísticas significativas, en que el material antiguo generó el mayor número de brotes; sin embargo, la mejor altura fue del material nuevo en todos los casos, mostrando diferencias altamente significativas ($pH=0.01$) solamente al final del tercer ciclo de multiplicación. Haciendo la comparación general de las tres etapas, la altura de los brotes es incrementada conforme el aumento de los ciclos de regeneración, específicamente con el material nuevo (Figura 3), mostrando visiblemente un mejor desarrollo y coloración de follaje. El mayor número de brotes se observó con el material antiguo sin diferencias estadísticas significativas ($pH=0.01$). La formación de raíces no fue evaluada en esta etapa; no obstante, el material espontáneamente formó raíces en la mayoría de frascos de ambos tratamientos, esto solamente ha sucedido en los casos en donde el cedro ha sido expuesto a altas concentraciones de citoquininas, arriba de 4 mg/l (Pérez *et al.*, 2004).

La interacción entre el número de brotes y altura de los mismos para ambos tratamientos no presenta ninguna diferencia estadística significativa ($pH=0.01$) en ninguno de los tres ciclos de multiplicación, no existiendo relación directa entre las variables, aunque se observó que en el material nuevo existe menor número de brotes relacionándose con una mayor altura y lo contrario ocurrió con el material antiguo.

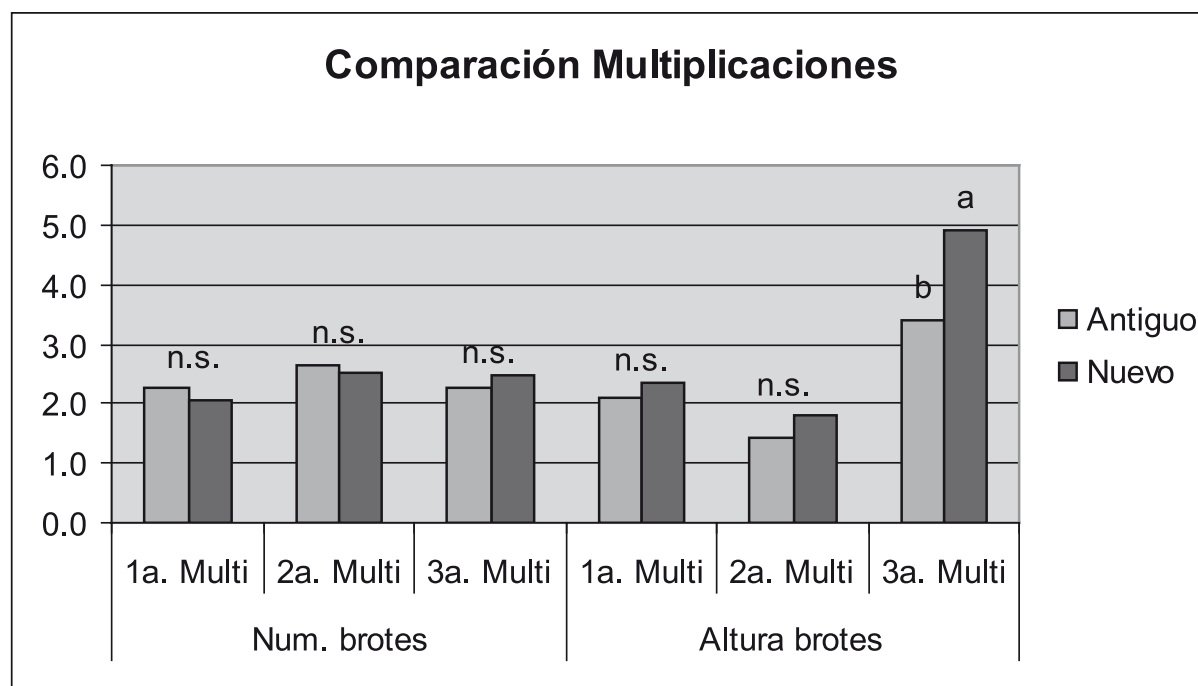
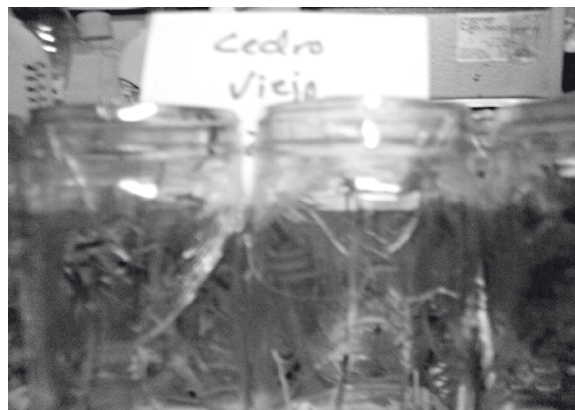


Figura 3. Comparación de material antiguo y nuevo de cedro (*Cedrela odorata*) para las variables número de brotes y altura de los mismos (cm) durante tres ciclos de multiplicación.

Fase de desarrollo

Dado que en esta etapa la mayoría de plántulas formó raíces al cabo de una semana y media, se procedió a evaluar el material al final de cuatro semanas y pasar a fase de aclimatación. En apariencia las plántulas lucían vigorosas en su mayoría y sin mucha formación de callo en la base (Figura 4). Este evento se puede atribuir a que la morfogénesis y el crecimiento de los cultivos de tejidos de especies leñosas prefieren concentraciones bajas de sales (Litz, 2006), y a que la sacarosa es fuente de energía para que las plantas desarrollen tejidos y órganos, como por ejemplo las raíces (Veirskov, 1988/Cit. por Pérez *et al.*, 2004).



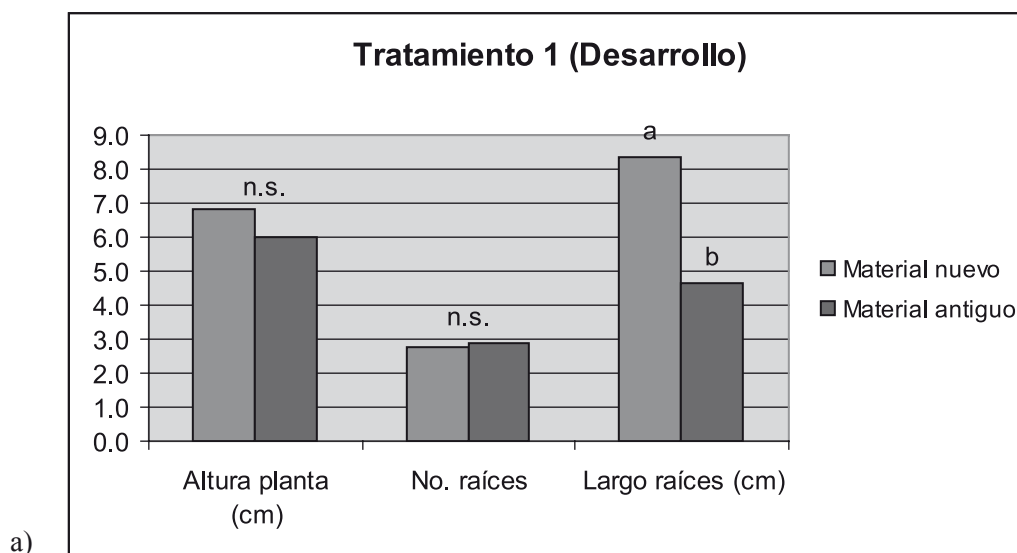


c)

Figura 4. 4a) Plantas completas con formación de raíz al final de la fase de desarrollo en cedro (*Cedrela odorata*), 4b) panorámica general de material de cedro nuevo, 4c) panorámica general de material de cedro antiguo.

Los parámetros evaluados en esta etapa para cada uno de los tratamientos fue: altura de planta (cm), número de raíces y largo de raíces (cm). Se utilizó el medio Woody Plant Medium (WPM) al 50% de macro y microsales, suplementado con 25 y 30 g/l de sacarosa (Anexo 1), según los mejores resultados obtenidos en esta fase por Pérez *et al.* (2004). En ese estudio se demostró que

las bajas concentraciones tanto de sales en los nutrimentos como de azúcar, pueden inducir el metabolismo autotrófico y favorecer una morfología normal de los brotes (García-Martín *et al.*, 2001/Cit. por Pérez *et al.*, 2004). Cuando en el tratamiento 1 (30 g/l de sacarosa) se comparó su efecto sobre material nuevo y antiguo se encontró solamente diferencias estadísticas significativas ($p < 0.01$) en el largo de raíces, siendo más largas en el material nuevo, estableciéndose una asociación positiva moderadamente fuerte entre la altura de la planta y el número de raíces desarrolladas. En el tratamiento 2 (25 g/l de sacarosa) no hubo superioridad sobre el origen de los materiales para ninguna variable. En el análisis factorial de los dos tratamientos junto con el factor origen, se establecen diferencias estadísticas significativas solamente para el caso del largo de raíces, que como se mencionó, fue superior con el material nuevo, siendo indiferente cualquiera de las dosis de sacarosa empleadas, aunque para la altura de planta y número de raíces fue superior en la dosis de 25 g/l de sacarosa pero sin diferencias estadísticas significativas ($p < 0.01$) (Figura 5).



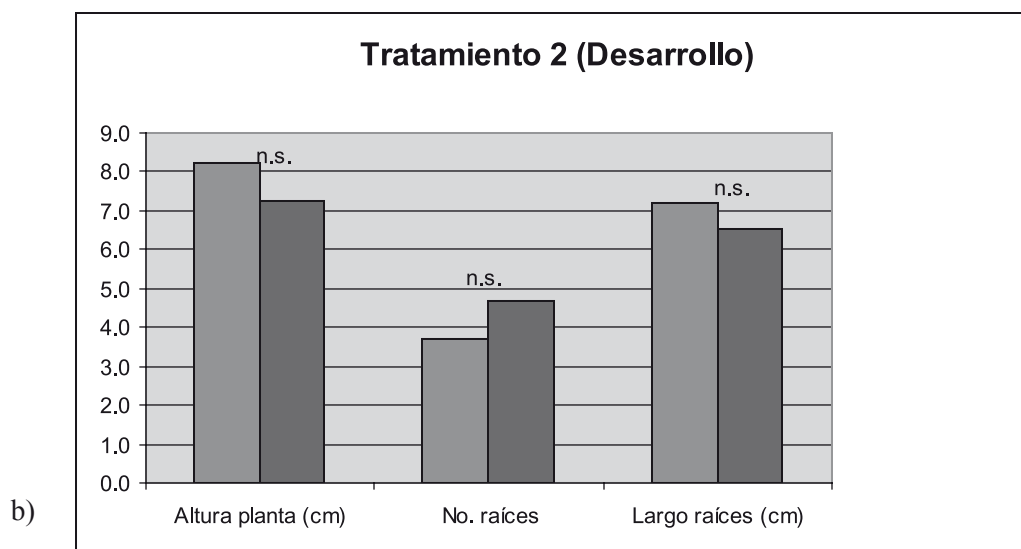


figura 5. Comportamiento de material de cedro en fase de desarrollo bajo dos tratamientos con medio de cultivo WPM, con dos dosis distintas de sacarosa, 5a) Tratamiento 1 (30 g/l de sacarosa), 5b) Tratamiento 2 (25 g/l de sacarosa).

6. CONCLUSIONES

Al igual que en el caso del protocolo de micropropagación de caoba (*Swietenia humilis*), el estudio en cedro es también pionero sobre la reproducción *in vitro* de forestales en nuestro país, por tanto, los resultados finales permiten servir de apoyo a posteriores programas de mejoramiento genético encaminados principalmente a la obtención de resistencia a la principal plaga como es la *Hypsipyla grandella* (Zeller).

Es importante conocer que al igual que en el caso de caoba, la altura de los explantes se va incrementando conforme los ciclos de multiplicación; sin embargo, la tendencia a producción de brotes disminuye. En general, el mayor número de brotes y altura de los mismos se obtuvo con el material nuevo, por el alto potencial de este tipo de tejidos.

Tal como sucedió en el ensayo de micropropagación de cedro de CATIE (Pérez *et al.*, 2004), en *Eucalyptus tereticornis* y en *Acacia nilotica* (Subbaiah y Minocham, 1990; Dewan *et al.*, 1992/Cit. por Pérez *et al.*, 2004), el enraizamiento espontáneo en la fase de desarrollo fue alto con ambas dosis de sacarosa; sin embargo en CATIE emplearon dosis de 30 y 40 g/l; en nuestro ensayo al trabajar con 25 g/l, se obtuvo un buen resultado, por lo tanto, también los costos se pueden reducir.

BIBLIOGRAFÍA

MUÑOZ, ABDELNOUR, A. (2006). Comunicación personal. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

CUÉLLAR, N., MÉNDEZ, E., DE LARIOS, S., DIMAS, L. (2003). Tendencias y perspectivas del sector forestal en El Salvador del Siglo XXI. PRISMA (Programa Salvadoreño de Investigación sobre Desarrollo y Medio Ambiente). San Salvador, El Salvador.

Mc COWN, B.H., LLOYD, G. (1981). Woody Plant Medium (WPM)- a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species. Hort. Sci. 16: 453.

LITZ, R. (2006). Comunicación personal. ENA (Escuela Nacional de Agricultura), San Andrés, El Salvador.

MONTES A, M. E. (2007) Metodología de micropropagación de segmentos nodales de caoba (*Swietenia humilis*), obtenidos mediante semilla seleccionada. Extraído el 2 de mayo de 2008 desde <http://www.unico.edu.sv/investiga/frames/rvr.php?accion=4>

MUÑOZ, T., S. (2003). Embriogénesis Somática en Cedro (*Cederla Odorata* Linnaeus) a partir de Cotiledones. Tesis Biol. Universidad Nacional Agraria de la Molina. Lima, Perú.

MURASHIGE, T. y SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

OFICINA DE POLÍTICAS Y ESTRATEGIAS. (2004). Especies Forestales con Potencial Productivo en El Salvador. Extraído el 5 de julio de 2005 desde [http:// www.mag.com.sv](http://www.mag.com.sv)

ORELLANA, M. (1997). Desarrollo de un sistema de cultivo *In vitro* para los explantes nodales de Caoba (*Swietenia marcrophylla*. King). Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 85 p.

PÉREZ, J., MESÉN, F., HILJE, L., AGUILAR, M.E. (2001). Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cederla odorata* L.: Optimización de la fase de multiplicación. Revista Forestal Centroamericana, San José, C.R.

PÉREZ, J., MESÉN, F., HILJE, L., AGUILAR, M.E. (2006). Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cederla odorata* L,: Fases de desarrollo y enraizamiento. Revista Forestal Centroamericana, San José, C.R.

ROCA, W.M. y MROGINSKI, L.A. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 969 p.

VALENTÍN, J. (2005). Comunicación personal. CEDEFOR, El Salvador.

VILLALOBOS, A., LEUNG, D.W., THORPE, T.A. (1984). Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. Physiol. Plant.