

Establecimiento *in vitro* de *Cedrela salvadorensis* Standl

Fecha de recepción: 11/02/2010

Fecha de aceptación: 25/02/2010

Bibiana Soto Vargas¹
Lisette Valverde Cerdas (†)
Alejandra Rojas Vargas²
Ana Hine Gómez³

Palabras clave

Cedrela salvadorensis, micropropagación, introducción *in vitro*, benciladenina.

Resumen

El objetivo del trabajo fue establecer una metodología para introducir el procedimiento *in vitro* como una alternativa de propagación para futuros trabajos de conservación o mejoramiento genético de la especie. Como material experimental se utilizaron tanto plántulas de invernadero de ocho meses de edad para la introducción de estaquillas como plántulas de semillas germinadas *in vitro* para la obtención de segmentos de nudo. En la desinfección de las estaquillas se utilizó Benlate® (Benomil) 0,5 gL⁻¹ y Agrimicin® (estreptomycin) 4,5 gL⁻¹. Los desinfectantes evaluados fueron NaOCl (3% i.a) durante 10 minutos y CaOCl (9,23% i.a) durante 25 minutos.

Todos los explantes se colocaron en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) que se complementó con 2.7 gL⁻¹ de gelrite y cuatro concentraciones de Benciladenina (BA) (0; 0,5; 1,5; 2,5 y 3,5 mgL⁻¹). El mejor método para la desinfección de las estaquillas fue NaOCl (3% i.a) durante 10 minutos. La mejor respuesta de las estaquillas de plántulas de invernadero se observó en la concentración de 0,5 mgL⁻¹ de BA; por su parte, la mejor respuesta de las plántulas germinadas *in vitro* fue en 2,5 mL⁻¹ de BA.

Key words

Cedrela salvadorensis, micropropagation, *In vitro* introduction, benciladenina.

Abstract

The objective of this work was to establish a methodology of *in vitro* introduction as a propagation alternative for future conservation or species improvement

1. Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional. Apdo. 86-3000. Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: biso24@yahoo.com
2. Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional. Apdo. 86-3000. Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: aroja@una.ac.cr
3. Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional. Apdo. 86-3000. Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: ahine@una.ac.cr

La biotecnología es una herramienta nueva que se está desarrollando en diferentes campos, en forma creciente y a escala global. A nivel forestal, cumple con dos objetivos básicos: el uso de los recursos genéticos y su mejoramiento en las plantaciones forestales, y el mantenimiento de la diversidad de los bosques naturales para la conservación.

projects. Eight-month seedlings from a greenhouse were used as the experimental material for the introduction of pegs and seedlings from *in vitro* germinated seeds to obtain knots segments. For the disinfestations of the pegs Benlate™ (Benomil) 0,5 gL⁻¹ and Agrimicin™ (estreptomycine) 4,5 gL⁻¹ were utilized. The evaluated disinfectants were NaOCl (3% a.i) for 10 minutes and CaOCl (9.23% a.i) for 25 minutes.

All the explants were cultivated in Murashige and Skoog (MS) medium complemented with 2.7 gL⁻¹ of gelrite and four concentrations of Benciladenina (BA) (0; 0,5; 1,5; 2,5 y 3,5 mgL⁻¹). The best method for the disinfestations of the pegs was NaOCl (3% a.i) for 10 minutes. The best results from the peg's seedlings at the greenhouse were obtained by using the 0,5 mgL⁻¹ of BA and for the *in vitro* germinated seedlings by using 2,5 mgL⁻¹ of BA.

Introducción

En Costa Rica se ha determinado que al menos 90 especies forestales con un alto valor ecológico, económico y cultural están amenazadas o en diferentes grados de peligro de extinción. Muchas poblaciones de estas especies han desaparecido o han sido drásticamente fragmentadas, reducidas y genéticamente erosionadas debido a un alto grado de explotación a lo largo del tiempo (Corea, 2005).

Un estudio de la comisión interinstitucional para la conservación de especies en peligro de extinción reveló que 30 de esas especies se encuentran en peligro crítico de extinción, entre las que se encuentra la *Cedrela salvadorensis*, conocida como cedro o cedro colorado. Perteneciente a la familia Meliaceae, es una especie que puede alcanzar 25m de altura, tiene un fuste corto y el uso de su madera para aprovechamiento ha ocasionado que en Costa Rica esté vedada su tala por decreto ejecutivo desde enero de 1997 (Jiménez, 1999).

La distribución de esta especie es muy limitada y presenta una alta reducción de su hábitat (74%) con un elevado índice de explotación (INBIO-Museo Nacional, 2005). *Cedrela salvadorensis* crece en elevaciones medias a bajas, en bosques que van de húmedos a secos semidecíduos; en elevaciones de medias a bajas, entre los 50 a los 1100 metros sobre el nivel del mar.

Se conoce solo de unos pocos árboles aislados en pequeñas áreas remanentes de bosque o que crecen en la ribera de ríos o quebradas, aunque generalmente presentan un mejor crecimiento en lomas o áreas bien drenadas. Su regeneración es prácticamente inexistente. Existe un desconocimiento de la especie, particularmente sobre sus sistemas de macropropagación y micropropagación (Jiménez, 1999).

La biotecnología es una herramienta nueva que se está desarrollando en diferentes campos, en forma creciente y a escala global. A nivel forestal, cumple con dos objetivos básicos: el uso de los recursos genéticos y su mejoramiento en las plantaciones forestales, y el mantenimiento de la diversidad de los bosques naturales para la conservación. (Martínez, Azpiroz, Rodríguez, Cetina, Gutiérrez, 2003). Por otra parte, gracias a técnicas de cultivo *in vitro* se puede incrementar el número de individuos de cualquier especie que se quiera conservar, o reproducir mediante clonación, como material de alto valor genético (Uribe-Moraga y Cifuentes, 2004).

El propósito de esta investigación fue establecer una metodología para la introducción y establecimiento *in vitro* de estaquillas de plántulas de vivero y conocer la respuesta *in vitro* de embriones cigóticos de *Cedrela salvadorensis*.

Materiales y métodos

Cultivo de embriones cigóticos de *Cedrela salvadorensis*. Se utilizaron frutos cerrados de cuatro fuentes: tres árboles

seleccionados (A1, A4, A8) donados por la Estación Experimental Forestal Horizontes del área de Conservación Guanacaste, y una mezcla variada provista por el proyecto “Conservación de especies maderables nativas con alto grado de erosión genética o en peligro de extinción”, del Instituto de Investigación y Servicios Forestales (Inisefor, Universidad Nacional).

Los frutos se cepillaron con una solución de agua y jabón líquido, luego se sumergieron en hipoclorito de sodio al 3% i.a por 40 minutos. Posteriormente, los frutos se lavaron tres veces con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar y se extrajeron los embriones.

Finalmente, los embriones se cultivaron en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) complementado con 30g de sacarosa (3% p/v) y 2,7 gL⁻¹ de gelrite. Se contabilizó el número de semillas por fruto y la muestra empleada fue de 306 semillas. El porcentaje de germinación y contaminación de los embriones se evaluó cada tres días durante un período de dos meses.

Inducción de brotes en los segmentos nodales

Las plántulas germinadas a los 30 días fueron seccionadas en segmentos de nudo y estos se distribuyeron en el medio de cultivo complementado con diferentes concentraciones de benciladenina (BA): 0; 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 mgL⁻¹ (Da Costa, Volkmer del Castillo, Netto y Viana, 2002).

Se llevaron a cabo evaluaciones semanalmente por un período de 45 días; asimismo, se utilizó un diseño irrestricto al azar con un total de 25 repeticiones por tratamiento. Los parámetros de evaluación fueron: número promedio de brotes por segmento de nudo y porcentaje de brotación en cada tratamiento.

Introducción y establecimiento de estaquillas de *Cedrela salvadorensis* provenientes de rebrotes de plántulas en invernadero

Se utilizaron plántulas de ocho meses de edad provistas por el proyecto “Conservación de especies maderables nativas con alto grado de erosión genética o en peligro de extinción” (Inisefor, Universidad Nacional), las cuales se trasladaron al invernadero.

Las plantas establecidas en condiciones de invernadero fueron tratadas primero con fungicida Benlate® y bactericida Agrimicin® a razón de 0,5 gL⁻¹ y 4,5 gL⁻¹ respectivamente, por un período de cinco semanas, e inmediatamente se les eliminó la yema apical y el 90% del área foliar.

Posteriormente, a los tallos se les realizó una aplicación de Nutrán® (nitrato de amonio 33,5% N) y se continuaron las aplicaciones con Benlate®, con un aumento en las dosis a 2,5 gL⁻¹, mientras que se mantuvo la concentración de Agrimicin® en 4,5 gL⁻¹. Además, a las estaquillas se les aplicó Kilol® (desinfectante natural antifúngico/antibacteriano) a una concentración de 5 mL⁻¹ por tres semanas más. Además, se contabilizó el número de rebrotes producidos por los tallos de las plántulas de *Cedrela salvadorensis* en el invernadero.

En el laboratorio, el material se dejó bajo el flujo de agua del grifo por 30 minutos. Seguidamente, las estaquillas fueron cepilladas para eliminar la contaminación adherida a la superficie y se colocaron en una solución de agua y jabón líquido más una gota de tween 80% por un lapso de 10 minutos en agitación constante.

Luego, se aplicaron dos tratamientos de desinfección: en el primero, los explantes se colocaron en hipoclorito de sodio 3% i.a de concentración por 10 minutos en agitación, y en el segundo, los explantes se dejaron en hipoclorito de calcio 9,23%

Las plantas establecidas en condiciones de invernadero fueron tratadas primero con fungicida Benlate® y bactericida Agrimicin® a razón de 0,5 gL⁻¹ y 4,5 gL⁻¹ respectivamente, por un período de cinco semanas, e inmediatamente se les eliminó la yema apical y el 90% del área foliar.

i.a por 25 minutos en agitación. En los dos tratamientos, las estaquillas se colocaron en el sonicador por un minuto.

Finalmente, en la cámara de flujo laminar se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril y se distribuyeron en viales de 25 mm de diámetro que contenían 25 mL de medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), complementado con 30g de sacarosa (3% p/v), 2,7 gL⁻¹ de gelrite y tres diferentes concentraciones de BA (0,5 mL⁻¹; 1,5 mL⁻¹ y 2,5 mL⁻¹) para la inducción de brotes. Los parámetros evaluados fueron: porcentaje de contaminación según tratamientos de desinfección y número de yemas. Las evaluaciones se realizaron cada semana.

Cuadro 1. Respuesta de los embriones cigóticos de *Cedrela salvadorensis* durante 14 días de cultivo *in vitro*.

Embriones	Fuente de semilla			
	A1	A4	A8	mezcla
Porcentaje germinados	100	74	65	82
Porcentaje sin respuesta	0	0	24	0
Porcentaje contaminados	0	7	5	14

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de BA en segmentos nodales provenientes de plántulas de *Cedrela salvadorensis* germinadas *in vitro*.

	Concentración mL ⁻¹				
	0	0.5	1.5	2.5	3.5
Promedio de brotes por nudo*	1.9	2.0	1.4	2.0	2.0
Porcentaje de nudos con brotes	93	100	100	100	70

P-value: 0.0720*

Nivel de significancia 5%

En todos los ensayos, el medio de cultivo se ajustó a un pH de 5,7 con NaOH y HCl. Los cultivos fueron colocados en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 25°C, con fotoperíodo de 16 horas de luz y una intensidad lumínica de 30 μmol m⁻² s⁻¹.

Se utilizó un diseño irrestricto al azar y se aplicó tanto un análisis de varianza como una prueba LDS de comparación de medias utilizando el programa estadístico statGraphics Plus versión 5.1.

Resultados

Cultivo de embriones cigóticos de *Cedrela salvadorensis*

Con la muestra utilizada se encontraron, en promedio, 42 semillas por fruto de *Cedrela salvadorensis*. El mayor porcentaje de contaminación se obtuvo con los embriones que provenían de semillas de la mezcla de varios árboles. Los porcentajes de germinación de los embriones fueron del 65 al 100%, dependiendo de la fuente semillera. La germinación se inició con la emisión de la radícula dos días después de su cultivo (cuadro 1).

Multiplificación de *Cedrela salvadorensis* por segmentos de nudo de plántulas germinadas *in vitro*

De acuerdo con el análisis estadístico, no hubo diferencias significativas (P>0.05) entre las concentraciones de BA evaluadas. El mayor número promedio de brotes por segmento nodal fue de 2,0 en todas las concentraciones, exceptuando la concentración de 1,5 mgL⁻¹. En la concentración de 3,5 mgL⁻¹ se presentó el menor porcentaje de explantes con brotes, pero esto no afectó el número promedio de brotes (cuadro 2). Los explantes igualmente respondieron a la inducción de brotes sin la adición de la citocinina, pero las diferencias se dieron en el crecimiento de los brotes que mostraron un mayor

desarrollo en la concentración de 2,5 mgL⁻¹ de BA (figura 1).

Introducción y establecimiento de estaquillas de *Cedrela salvadorensis* provenientes de rebrotes de plántulas de invernadero

De cada tallo de las plántulas de *Cedrela salvadorensis* en condiciones de invernadero, se obtuvo en promedio tres rebrotes de diferente longitud.



Brotes inducidos en la concentración de 2,5 mL⁻¹ de BA.

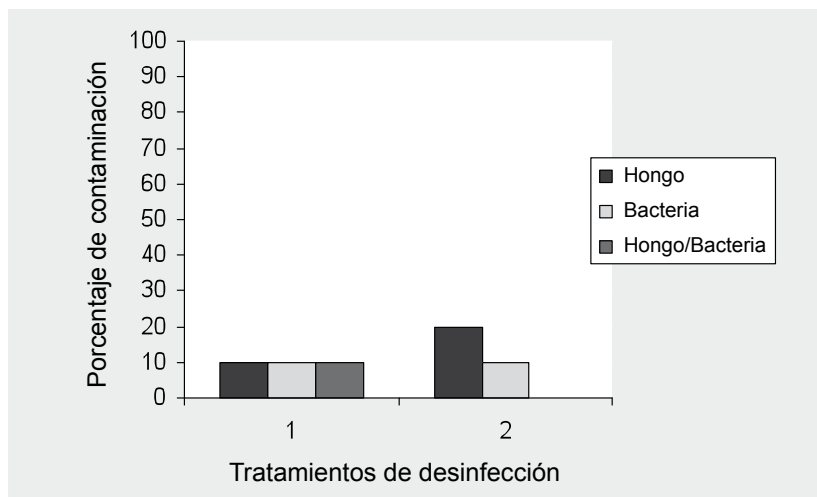


Figura 2. Porcentaje de contaminación de estaquillas de *Cedrela salvadorensis*.

Desinfección del material.

De acuerdo con los resultados, los porcentajes de contaminación en los dos tratamientos de desinfección aplicados fueron inferiores al 20%.

En el tratamiento uno (hipoclorito de sodio 3% i.a de concentración por 10 minutos) fue donde se obtuvo el mayor porcentaje de estaquillas libres de contaminación. Los explantes que tenían bacteria persistente también presentaron contaminación por hongos (figura 2).

En el tratamiento dos (hipoclorito de calcio 9,23% i.a de concentración por 25 minutos) los explantes no presentaron contaminación por hongo/bacteria, pero el porcentaje de contaminación por hongo fue mayor (figura 2).

La respuesta de las microestacas fue significativa ($P < 0,05$) para las concentraciones de BA evaluadas. El mayor número promedio de brotes por nudo y el mayor porcentaje de explantes con brotes se observó en la concentración de 0,5 mgL⁻¹ de BA; sin embargo, los brotes no presentaron mucho desarrollo foliar pero sí un aspecto normal del ápice. En la concentración de 1,5 mgL⁻¹, los brotes tenían un buen desarrollo de tallo y área foliar. En la concentración de 2,5 mgL⁻¹ de BA, los explantes mostraron un mayor alargamiento del tallo y de desarrollo foliar, pero se manifestó hiperhidricidad, especialmente en las hojas (cuadro 3 y figura 3).

Discusión

El método de desinfección con NaOCl utilizado en los frutos presentó un buen resultado, ya que se logró obtener un elevado porcentaje de embriones cigóticos libres de microorganismos. La contaminación en la mezcla de semillas se pudo deber a la manipulación y a las condiciones de almacenamiento. El porcentaje de germinación de los embriones varió del 80% al 100%, dependiendo de la fuente

Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de BA en estaquillas de *Cedrela salvadorensis* en condiciones *in vitro* a partir de plántulas de invernadero.

	Concentración m.L ⁻¹		
	0,5	1,5	2,5
Promedio de brotes por microestaca*	2	1,0	1,0
Porcentaje de nudos con brotes	83,3	62,5	67

P-value: 0,0005*

Nivel de significancia 5%



Brotes inducidos en estaquillas provenientes de plántulas de invernadero empleando la concentración de 2,5 mL⁻¹ de BA.

semillera. Además, estas diferencias podrían deberse al genotipo (Perik, 1990).

Las plántulas de *Cedrela salvadorensis* demostraron una rápida capacidad de rebrote en condiciones de invernadero, como posible respuesta a la aplicación de Nutran®, el cual estimula la producción de rebrotes. Al cuantificar el número de rebrotes en las plántulas se puede determinar la cantidad de material para cada ciclo de introducción *in vitro* y, consecuentemente, el número de yemas inducidas.

Aunque las plántulas en el invernadero fueron fumigadas con fungicidas y bactericidas, y luego las estaquillas de los rebrotes de las plántulas germinadas en invernadero fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (tratamiento uno) e hipoclorito de calcio (tratamiento dos), no fue suficiente para eliminar completamente los contaminantes de los explantes. Sin embargo, la desinfección de dichas estaquillas con hipoclorito de sodio fue efectiva en un 90%, posiblemente debido a las aplicaciones previas realizadas en invernadero; además, el tejido joven, al haberse formado recientemente, es más fácil de desinfectar y establecer (Smith, 2000).

No se pudo erradicar la presencia de una bacteria persistente, presumiblemente porque se pudo deber a que los microorganismos asociados a los tejidos de las plantas *in vitro* pueden permanecer latentes en el interior de las células, los espacios intercelulares o los haces conductores, y quedar protegidos de los agentes químicos (Alvarado, 1998). Sin embargo, otro factor que puede influir en la aparición de microorganismos son los tratamientos de desinfección, ya que pueden ocasionar estrés en el tejido (Ewald, 1992).

De acuerdo con Valverde, Rojas y Hine, (2008), en el cultivo *in vitro* de *Cedrela odorata* es frecuente observar la presencia de una bacteria, con un comportamiento similar al encontrado en *Cedrela*

Finalmente, el cultivo de tejidos vegetales como parte de la biotecnología cada día es más necesaria y útil en la recolección, intercambio y preservación de los recursos genéticos de especies forestales amenazadas, en peligro de extinción o con un gran valor económico a nivel industrial, debido a que mundialmente se ha incrementado la demanda de productos forestales.

salvadorensis. Lo anterior podría suponer que existe presencia de un microorganismo latente en el explante. No obstante, para corroborar este hecho se deben realizar las pruebas fitopatológicas correspondientes.

Los tratamientos de desinfección aquí evaluados podrían utilizarse como guía para la introducción *in vitro* de rebrotes de otras especies forestales del trópico. Se considera que se podrían obtener mejores resultados de desinfección en la época seca, ya que el material se obtuvo en la estación lluviosa, época en la que prolifera gran cantidad de hongos y mohos, los cuales dispersan las esporas a través del viento y el agua (Alvarado, 1998).

Las estaquillas respondieron mejor al medio de cultivo con 0,5 m.L⁻¹ de BA e igualmente se obtuvo un número máximo de dos yemas por nudo. A pesar de que las yemas presentaron buen desarrollo en la concentración de 2,5 mg.L⁻¹ de BA, la hiperhidricidad presentada en estos brotes afecta a dos de los procesos más importantes que realizan las hojas: la fotosíntesis y el intercambio gaseoso, lo cual impide el establecimiento de las plántulas micropropagadas en el campo.

Las causas de estas malformaciones están ligadas a ciertas características del cultivo *in vitro*: factores nutricionales superfluos (elementos minerales y carbohidratos) y elevadas dosis de reguladores de crecimiento, que producen un efecto subtóxico global; una baja intensidad luminosa durante la incubación; la humedad relativa y un potencial hídrico, las cuales son la clave principal para explicar estas complejas anomalías morfogénicas producidas *in vitro* (López, 1996).

Por otro lado, la hiperhidricidad en algunos casos es reversible y el material transferido a un medio fresco puede presentar un desarrollo normal. Esta hiperhidricidad pudo haber afectado el número promedio de brotes en esta concentración, ya que en algunos explantes las estructuras no

brotaron. Se requiere dar seguimiento al material obtenido en esta investigación para evaluar el efecto de la hiperhidricidad en el desarrollo de las yemas. Según López (1996), dentro de la complejidad del problema de hiperhidricidad pueden haber soluciones que permiten a las plantas micropropagadas llegar en las mejores condiciones morfológicas, fisiológicas y funcionales posibles al período de aclimatación y transplante a condiciones *ex vitro*.

Finalmente, el cultivo de tejidos vegetales como parte de la biotecnología cada día es más necesaria y útil en la recolección, intercambio y preservación de los recursos genéticos de especies forestales amenazadas, en peligro de extinción o con un gran valor económico a nivel industrial, debido a que mundialmente se ha incrementado la demanda de productos forestales.

Agradecimientos

Al señor Eugenio Corea, encargado del proyecto “Conservación de especies maderables nativas con alto grado de erosión genética o en peligro de extinción”, del Instituto de Investigación y Servicios Forestales (Inisefor), Universidad Nacional, por facilitar el material experimental utilizado en este trabajo.

Bibliografía

- Alvarado, Y. (1998). *Contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de Plantas, 81-104.
- Corea, E. *Proyecto Conservación de especies maderables nativas con alto grado de erosión genética o en peligro de extinción*. INISEFOR. <http://www.una.ac.cr/inis/docs/proyIExtin.pdf> (Fecha de consulta: 10 de agosto de 2006).
- Da Costa Nunes, E., Volkmer de Castillo, C., Netto Mato, F. & Viana, AM. (2002) *In vitro cultura of Cedrelafissi/is*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 70, 259-168.

- Edwald, D. (1992). *Aims and results of basic Research in the institute of Forest Tree Breeding in Waldsieversdorf*. *Silvae Genet.* 41, 3.
- INBIO y Museo Nacional de Costa Rica. *Evaluación y categorización del estado de conservación de plantas en Costa Rica. Metodología para evaluar el estado de conservación de plantas en Costa Rica*. Documento sin publicar.
- Jiménez, Q. (1999). *Árboles maderables en peligro de extinción en Costa Rica* (2a ed.). San José: Instituto Nacional de Biodiversidad, 163.
- Jiménez, Q. (1999). *Cedrela Salvadorensis Standl.* <http://darnis.inbio.ac.cr/FMPro?DB=UBIpub.fp3&-lay=WebAll&-Format=/ubi/detail.html&-Op=bw&id=2166&-Find> (Fecha de consulta: 2 de noviembre de 2009).
- López, C. (1996) *Vitrificación de plantas cultivadas in vitro*. Encuentros en la Biología. Ed. G. Claros, 28.
- Martínez, R., Azpiroz, H., Rodríguez, 1., Cetina, V. y Gutiérrez, M. (2003, enero-junio). *Aplicaciones de la biotecnología en los recursos genéticos forestales*. *Revista Chapingo*, 9 (001), 13-34.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Pant.*, 15,473-479.
- Perik, R. (1990). *Cultivo in vitro de plantas superiores*. Madrid: Ediciones Mundiprensa, 326.
- Smith, R. (2000). *Plant Tissue Culture*. California: Academic Press, 60-73.
- Uribe, M. y Cifuentes, G.L. (2004). *Aplicación de técnicas de cultivo in vitro ed Isa propagación de Legrandia concinna*. *Bosque*, 25 (1): 129-135.
- Valverde, L., Rojas, A, & Hine, A *In vitro propagation of Albizia guachapele, Cedrela odorata, Playmiscium, pinnatu, and Guaiacum sanctum*. *Plan Tissue Cult & Biotech*, 18 (2), 151-156.