

INDUCCIÓN DE LA BROTAÇÃO A PARTIR DE ESTACAS DE CEDRO (*CEDRELA ODORATA* L.) Y COMPORTAMIENTO DE INDICADORES DE CRECIMIENTO EN LOS BROTES OBTENIDOS

INDUCTION OF BUD FROM STAKES CEDAR (*CEDRELA ODORATA* L.) AND PERFORMANCE INDICATORS DERIVED GROWTH IN BUDS

M. SC. MILADYS DELGADO-MÉNDEZ,¹ TÈC. YAILÍN BELTRÁN-GONZÁLEZ,¹ DR. C. ROLANDO GARCÍA-GONZÁLEZ,² DR. C. MARCOS DAQUINTA-GRADAILLE,³ DR. C. CARLOS E. ARAGÓN-ABREU³ E ING. RENÉ C. RODRÍGUEZ-ESCRIBA³

¹UCTB Estación Experimental Agro-Forestal Camagüey. Ave. Ignacio Agramonte 178, Los Coquitos, Camagüey, Cuba, camaguey@forestales.co.cu

²Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Católica del Maule. Ave. San Miguel 3605, Casilla 617, Talca, Chile

³Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km 9, C.P. 69450, Ciego de Ávila, Cuba

RESUMEN

El cedro (Cedrela odorata L.) es una de las especies más importantes para el sector forestal cubano; sin embargo, actualmente existen problemas relacionados con la explotación intensiva de sus plantaciones naturales. Las técnicas de cultivo in vitro, aplicadas en árboles con edad suficiente para que expresen características de interés, constituyen un método efectivo para reducir el período de tiempo necesario para la obtención de plantaciones base mejoradas. La clonación de árboles maduros es generalmente difícil, pero puede lograrse con el manejo de diferentes factores en el rejuvenecimiento del material vegetal. La presente investigación tuvo como objetivo inducir la brotación y el rejuvenecimiento de los brotes en estacas de cedro colocadas en cuatro soluciones de reguladores de crecimiento, así como evaluar el comportamiento de indicadores de crecimiento (masa fresca (g) y masa seca (g)) en los brotes obtenidos, con vistas a obtener brotes de calidad para su posterior introducción al cultivo in vitro.

Palabras claves: *cedro, estacas, brotación, rejuvenecimiento, indicadores de crecimiento.*

INTRODUCCIÓN

El cedro (*Cedrela odorata* L.) es una de las especies más importantes para el sector forestal cu-

ABSTRACT

The Cedar (Cedrela odorata L.) is one of the most important species for the Cuban forest sector, however currently there are problems related to intensive exploitation of natural plantings. The in vitro culture techniques, applied in trees with characteristics sufficient to express interest age is an effective method to reduce the time necessary for obtaining improved plantations basis. Cloning of mature trees is usually difficult but can be achieved with the use of different factors in the rejuvenation of the plant material. The present study aimed to induce sprouting and rejuvenation of outbreaks in cedar stakes placed in four solutions of growth regulators and evaluate the behavior of indicators of growth (fresh weight (g) and dry mass (g)) in shoots obtained, in order to obtain quality sprouts for introduction to the culture in vitro.

Keys words: *cedar, cuttings, shoot development, rejuvenating, indicators of grow.*

bano debido a la alta calidad de la madera y sus usos relevantes en la construcción de muebles

finos y la fabricación de cajas de tabaco. Por su importancia económica las poblaciones naturales de *Cedrela odorata* L. enfrentan actualmente serios problemas asociados con la sobreexplotación y la degradación ambiental [Lamb *et al.*, 2005]. Por otro lado, el cultivo intensivo de esta especie en plantaciones comerciales, lo cual podría ayudar a aliviar la presión en las poblaciones naturales, se encuentra amenazado por el barrenador de vástagos *Hypsipyla grandella* Zellar [O'Neil *et al.*, 2001].

En Cuba el desarrollo de plantaciones de maderas preciosas de la familia Meliaceae se limita por los largos ciclos biológicos de estas especies, su susceptibilidad al ataque de plagas y como consecuencia el rechazo de los productores a realizar este tipo de plantaciones. Como una alternativa a las técnicas de silvicultura clásica, la propagación *in vitro* de especies arbóreas ha demostrado ser una estrategia rápida para la producción de plantaciones comerciales, restauración forestal [Haggman *et al.*, 2006], producción de biomasa forestal, así como conservación y rejuvenecimiento de germoplasma élite [Husain *et al.*, 2008].

En algunas especies forestales el uso de técnicas vegetativas para su propagación y protección se viene practicando desde siglos anteriores, realizándose diversos trabajos orientados a encontrar métodos y técnicas que permitan propagar con eficiencia el material mejorado de un gran número de especies. Se han desarrollado importantes investigaciones científicas en la propagación de árboles pertenecientes a la familia de las Meliáceas. El género *Cedrela*, al cual pertenece la especie en estudio, ha sido objeto de investigaciones en el campo de la micropropagación. Pérez *et al.* (2003) experimentaron en la micropropagación de *Cedrela odorata* L. a partir de semillas. Otros resultados para el cedro incluyen el cultivo de brotes apicales [Maruyama *et al.*, 1997] y la micropropagación de segmentos nodales y fragmentos de hipocótilos derivados de plántulas obtenidas a partir de semillas [Valverde, 1998]. Nunes *et al.* (2007) informaron estudios en la micropropagación de *Cedrela fissilis* Vell, y Peña-Ramírez *et al.* (2010) trabajaron en el establecimiento de un protocolo para el rejuvenecimiento de árboles adultos élites de cedro. No obstante estos resultados, es necesario investigar más en el establecimiento de una me-

todología que permita el trabajo con material vegetal adulto para poder trabajar con genotipos seleccionados e integrar estas técnicas a los programas de mejora genética de la especie. Las técnicas de cultivo *in vitro*, aplicadas en árboles con edad suficiente para que expresen características de interés, constituyen un método efectivo para reducir el período de tiempo necesario para la obtención de plantaciones base mejoradas. La clonación de árboles maduros es generalmente difícil [Sánchez y Ríos, 2005], pero puede lograrse con el manejo de diferentes factores en el rejuvenecimiento del material vegetal. La presente investigación tuvo como objetivo ensayar diferentes soluciones de reguladores de crecimiento para la inducción de la brotación y el rejuvenecimiento de material vegetativo de cedro, así como evaluar el comportamiento de indicadores de crecimiento en los brotes obtenidos con vistas a lograr brotes de calidad para su posterior introducción al cultivo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se desarrollaron en el Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila, en colaboración con la UCTB Estación Experimental Agroforestal Camagüey. Se utilizó material vegetal de plantas de cedro (*Cedrela odorata* L.) que se localizaron previamente en la Estación Experimental Agroforestal de Camagüey. Los ejemplares de cedro tenían una edad biológica estimada de 10 a 12 años y una altura de 12 m. Se seleccionaron estacas terminales aéreas, bien diferenciadas, con presencia visible de los brotes axilares. La longitud de todas las estacas se estableció por encima de los 10 cm, y el diámetro de la base fue de 1 cm. El corte en los extremos basales y terminales se realizó de manera longitudinal con una inclinación de 45°. Se realizó la defoliación de las estacas y la eliminación de la dominancia apical a través de la escisión de la yema apical en cada una de ellas. Las estacas se introdujeron en frascos de vidrio de 8 cm de diámetro y 19 cm de altura, con un volumen de solución de aproximadamente $\frac{1}{4}$ de la altura total de la estaca. Para el diseño de las soluciones de inducción de la brotación se escogió la concentración de 5 mg/L de BAP, según resultados informados por Guevara *et al.* (1992) durante el estudio de la brotación de estacas de

cedro dulce (*Cedrela tonduzii*) ante diferentes concentraciones de 6-BAP, así como lo indicado por García *et al.* (2004) para la inducción de la brotación en estacas de cedro. El experimento contó con los siguientes tratamientos:

Solución I: Agua + 6-BAP (5,0 mg/L)

Solución II: Agua + 6-BAP (5,0 mg/L) + AIB (1,0 mg/L)

Solución III: Agua + 6-BAP (5,0 mg/L) + AIA (1,0 mg/L)

Solución IV: Agua (control)

El experimento se mantuvo bajo condiciones naturales de fotoperiodicidad, con aproximadamente 12 h de luz/ 12 h de oscuridad, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa y temperatura ambiente de $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. La humedad relativa osciló entre el 70 y el 85 %. Los ensayos se desarrollaron en octubre y noviembre. La solución estimuladora de la brotación se cambió con una frecuencia de 10 días, manteniéndose las estacas por un período de 30 días en las soluciones de inducción. Para cada tratamiento se hicieron tres réplicas con un total de 12 estacas por tratamiento, donde cada una de las estacas constituyó una unidad experimental.

Se estableció como criterio de evaluación la supervivencia de las estacas en las diferentes soluciones a los 21 días de montado el experimento. Todas las evaluaciones se llevaron a cabo en horas tempranas de la mañana, aproximadamente en el horario comprendido entre las nueve y las diez de la mañana. También se evaluaron en los brotes obtenidos los indicadores de crecimiento: masa fresca (g) y masa seca (g).

Para la determinación de la masa fresca (g) y la masa seca (g) los brotes se tomaron a los 21 días de montado el experimento, y siempre en horas tempranas de la mañana. Se determinó la masa inicial de los brotes para cada una de las estacas en cada tratamiento (masa fresca). Para la obtención de masa seca los brotes se colocaron durante 72 h a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ en una estufa de convección (HSA) hasta obtener una masa constante. Para cada tratamiento se hicieron tres réplicas con un total de 27 estacas por tratamiento, donde cada una de las estacas constituyó una unidad experimental.

Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 11.5. El procesamiento y análisis de los resultados se realizó a través de una prueba ANOVA de un factor, como análisis paramétrico. La prueba ANOVA de un factor se siguió con una prueba de Tukey para un 5 %. Previamente siempre se demostró la distribución normal y homogeneidad de varianza, según las pruebas de Kolmogorov-Smirnov (5 %) y Levene (5 %), respectivamente. Los datos de porcentaje se transformaron de la siguiente manera: $y = 2 \arcsen(\sqrt{x/100})$. Los experimentos se realizaron bajo un diseño completamente aleatorizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La siguiente figura muestra la respuesta de las estacas de cedro ante las diferentes soluciones de inducción a los 14 días de montado el experimento.



Figura 1. Estacas de cedro (*Cedrela odorata* L.) a los 14 días de tratadas. Estacas de cedro brotadas en solución de agua + 6-BAP (5,0 mg/L) (A). Estacas de cedro brotadas en solución de agua + 6-BAP (5,0 mg/L) (izquierda), y a la derecha estacas de cedro colocadas en solución de agua + 6-BAP (5,0 mg/L) + AIA (1,0 mg/L) (B). Estacas de cedro brotadas en agua (control) (C).

Como puede observarse en la *Fig. 1A*, las estacas colocadas en solución de agua + 6-BAP (5,0 mg/L)

emitieron mayor cantidad de brotes, y estos fueron también de mayor vigor en comparación con los

brotos emitidos por las estacas colocadas en solución de agua + 6-BAP (5,0 mg/L) + AIA (1,0 mg/L) (Fig. 1B), y con relación también a los brotes emitidos por las estacas colocadas en agua (Fig. 1C). La Fig. 1C muestra que las estacas colocadas en agua (control) emitieron menor cantidad de brotes, y estos fueron de menor vigor en comparación con el resto de las soluciones. En todos los tratamientos las estacas comenzaron a emitir sus brotes entre los cinco y siete días a partir de su inmersión en las soluciones evaluadas, y estos brotes comenzaron su formación mostrando una coloración verde intensa.

En la Tabla 1 se representa la supervivencia (%) de las estacas en las diferentes soluciones de inducción a los 21 días de iniciados los tratamientos.

TABLA 1
Porcentaje de supervivencia de las estacas de cedro (*Cedrela odorata* L.) en las diferentes soluciones de inducción evaluadas a los 21 días de montado el experimento

Tratamientos	Supervivencia a los 21 días (%)
Solución I	91,66 a
Solución II	91,66 a
Solución III	100 b
Solución IV	83,66 c
Es = ± 0,05	

Letras diferentes para tratamientos que difieren entre sí (ANOVA, Tuckey, $p < 0,05$).

Solución I: Agua + 6-BAP (5,0 mg/L)

Solución II: Agua + 6-BAP (5,0 mg/L) + AIB (1,0 mg/L)

Solución III: Agua + 6-BAP (5,0 mg/L) + AIA (1,0 mg/L)

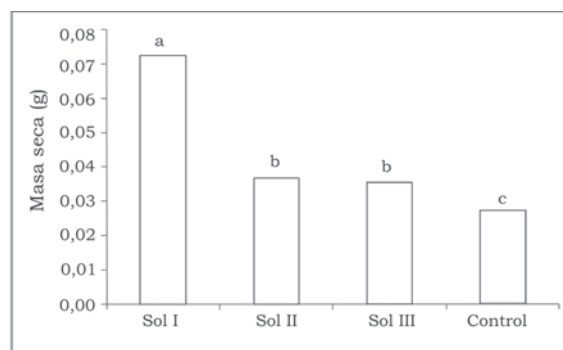
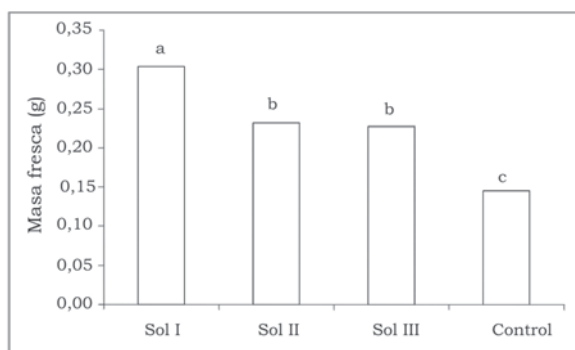
Solución IV: Agua (control)

Como puede observarse en la tabla, a los 21 días de montado el experimento el indicador supervivencia de las estacas mostró diferencias significativas entre los tratamientos, encontrándose el mayor valor para el tratamiento con la solución III. Las estacas tratadas con las soluciones I y II mostraron altos valores de supervivencia.

El tiempo máximo de cultivo en las soluciones de inducción se estableció en los 21 días, pues se observó que a partir de este momento los brotes comenzaron a perder calidad fisiológica, comenzando con la pérdida de la turgencia hasta la muerte y su caída. Además, se considera un brote de calidad máxima para ser introducido al cultivo *in vitro* aquel que presente alta turgencia y poca resistencia al corte del escarpelo, la consistencia de la epidermis debe ser herbácea y deben presentar un pobre desarrollo de los tejidos vasculares.

La Fig. 2 muestra los resultados de las determinaciones de masa fresca (g) y masa seca (g) en brotes de cedro, provenientes de las estacas colocadas en las diferentes soluciones de inducción.

Como puede observarse en la figura, el mayor valor de masa fresca (MF) se obtuvo en los brotes provenientes de las estacas colocadas en la solución I (agua + 6-BAP (5,0 mg/L) con diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de los tratamientos (Fig. 2A). Para el caso de la masa seca (Fig. 2B) se obtuvo un resultado similar, siendo también la solución I la de mejores resultados, con diferencias estadísticamente superiores al resto de los tratamientos.



2A: Masa fresca. Letras diferentes para tratamientos que difieren entre sí (ANOVA, Tuckey, $p < 0,05$, Media general: MG = 0,23, Error estándar: Es = 0,02, n = 9). 2B: Masa seca (ANOVA, Tuckey, $p < 0,05$, Media general: MG = 0,05, Error estándar: Es = 0,004, n = 9). Solución I: agua + 6-BAP (5,0 mg/L). Solución II: agua + 6-BAP (5,0 mg/L) + AIB (1,0 mg/L). Solución III: agua + 6-BAP (5,0 mg/L) + AIA (1,0 mg/L); control: agua.

Figura 2. Masa fresca y masa seca de brotes de cedro (*Cedrela odorata* L.) obtenidos a partir de estacas tratadas con diferentes soluciones de inducción a los 21 días de iniciados los tratamientos.

Los mayores valores de masa fresca y masa seca obtenidos en los brotes correspondientes a la solución I y con resultados estadísticamente superiores con respecto al resto de los tratamientos corresponden con los resultados de mayor número de brotes totales, y mayor valor de brotación media por estaca informados por García *et al.* (2004) para brotes de cedro obtenidos a partir de estacas tratadas con las mismas soluciones de inducción. La solución I está compuesta por el 6-BAP, el cual es un análogo sintético de las citoquininas naturales. Se conoce que estos compuestos son eficientes en estimular la formación de tejidos verdes, ya que activan los cloroplastos, se forman más hojas y el tallo herbáceo del brote se desarrolla más. Estimulan también la división celular y los procesos de desarrollo. Adicionalmente, en los tejidos tratados promueven la ruptura de la dominancia apical y estimulan el crecimiento y desarrollo de las yemas axilares [Salisbury y Ross, 1992].

Estos resultados corroboran la ventaja del uso de esta solución de inducción (solución I) con respecto a la cantidad de brotes y su calidad en cuanto a su masa. Los brotes que presentan una mayor masa fresca y masa seca pueden estar mejor preparados para entrar en un proceso de implantación precedido de una desinfección, donde el tamaño del brote, su grado de hidratación y su robustez son elementos determinantes en el éxito de este proceso. La masa fresca y la masa seca son elementos estrechamente relacionados a estos indicadores anteriormente mencionados. Teniendo en cuenta los indicadores de supervivencia (Tabla 1) y los indicadores de crecimiento masa fresca y masa seca (Fig. 2), se consideró que los brotes obtenidos a partir de las estacas colocadas en la solución I presentaron las características más adecuadas para la introducción al cultivo *in vitro*.

CONCLUSIONES

- A los 21 días de montado el experimento las estacas colocadas en las soluciones I y II mostraron altos valores de supervivencia.
- El tiempo máximo de cultivo de las estacas en las soluciones de inducción se estableció en los 21 días.

- Los brotes provenientes de estacas de cedro tratadas con la solución que contenía 5 mg/L de BAP (Solución I) mostraron mayores valores de masa fresca y masa seca, resultando ser los más adecuados para ser introducidos al cultivo *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- GARCÍA, R. *ET AL.*, 2004. «Introducción al cultivo *in vitro* de cedro (*Cedrela odorata* L.)». Memorias del III Congreso Forestal de Cuba. Ciudad de la Habana, 13-17 de septiembre, 2004.
- GUEVARA, E.; HIDALGO, N.; MURILLO, O. 1993. «Cultivo *in vitro* de cedro dulce (*Cedrela tonduzii*)», *Tecnología en Marcha* (CR) 11 (3): 10-16.
- HÄGGMAN, H. *ET AL.* 2006. «Somatic Embryogenesis of pine species: from functional genomics to plantation forestry», *Dig. Plant. Cell. Monogr.* (US) 2: 119-140.
- HUSAIN, M.K.; ANIS, M.; SHAHZAD, A. 2008. «In vitro propagation of a multipurpose leguminous tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using nodal explants». *Acta Physiologiae Plantarum* (US) 30: 353-359.
- LAMB, D.; ERSKINE, P.D.; PARROTTA, J.A. 2005. «Restoration of degraded tropical forest landscapes», *Science* (US) 310 (5754):1628-1632.
- MARUYAMA, E. *ET AL.* 1997. «Germplasm conservation of the tropical forest trees *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart. and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don. By shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12–25 °C», *Plant. Cell. Rep.* (US) 16: 393-396.
- NUNES, E.C. *ET AL.* 2007. «Micropropagation of *Cedrela Fissilis* Vell. (Meliaceae)». En: Jain and H. Häggman, eds, *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. pp. 221-235.
- O'NEIL, G.A. *ET AL.* 2001. «Strategies for genetic conservation of trees in the Peruvian Amazon», *Biodivers. Conserv.* 10: 837-850.
- PEÑA-RAMÍREZ, Y.J., *ET AL.* 2010. «Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured *in vitro* using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species», *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 46: 149-160.
- PÉREZ, J. *ET AL.* 2003. «Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Optimización de la fase de multiplicación», *Revista Forestal Centroamericana* 38: 24-35.
- SALISBURY, F.B.; C.W. ROSS: *Fisiología Vegetal*. Grupo Ed. Iberoamérica, pp. 339-451, 1992.
- SÁNCHEZ-OLATE, M.; RIOS, D.G. 2005. *Bioteología vegetal en especies leñosas de interés forestal*. Ed. Austral.
- SPSS. 2002. *Statistics Package for Social Science, User Guide Version 11.5.0*, SPSS Inc. for Windows.
- VALVERDE, C.L.; DUFOUR, M.; VILLALOBOS, V.M. «*In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrela odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae)», *Biol. Trop* 46: 225-228, 1998

RESEÑA CURRICULAR

Autora principal: Miladys Delgado-Méndez

Licenciada en Microbiología, máster en Biotecnología Vegetal, investigadora agregada de la Estación Experimental Agro-Forestal Camagüey, su labor investigativa ha estado dirigida en las temáticas de Mejoramiento de Especies de Interés Forestal mediante métodos biotecnológicos. Ha participado activamente en eventos científicos, tanto nacionales como internacionales, y recibido varios cursos de posgrado con resultados satisfactorios.

XILOTECA DE MADERAS CUBANAS JULIAN ACUÑA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRO-FORESTALES



La Xiloteca del Instituto de Investigaciones Agro-Forestales (INAF), fue fundada en 1970 por el Ingeniero Alberto Ibáñez Drake. Está adscrita desde 1977 al Index Xylariorum Institutional Wood Collection of the World.