

---

## **Establecimiento de un protocolo para la germinación *in vitro* e inducción a callo embriogénico de cedro (*Cedrela montana*) a partir de embriones zigóticos.**

Santamaria. J. Ana. L<sup>1</sup>., Ing. Páez. Tatiana<sup>2</sup>., Ing. Soria. Norman<sup>3</sup> & Ing. Reyes. Cristian<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Micropropagación vegetal, Empresa Pública Municipal de Movilidad y Obras Públicas Quito- - Vivero de Cununyacu, 2012.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ESPE.

---

### **RESUMEN**

La presente investigación tiene como fin, el de generar plántulas viables a nivel de laboratorio, por lo cual se ha establecido un protocolo para la Germinación *in vitro* e Inducción a callo embriogénico de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, a partir de embriones zigóticos, especie de interés para el Distrito Metropolitano de Quito. A partir de este proyecto se pudo establecer medios idóneos para la desinfección los cuales fueron T2 que contiene una concentración de 0.5% v/v de hipoclorito de sodio y T7 que corresponde al uso de peróxido de hidrógeno en concentración de 3% v/v los cuales inhibieron el crecimiento de hongos exógenos, bacterias y aún mejor evitó la necrosis de los embriones. En la etapa de germinación los mejores tratamientos estuvieron suplementados con G3 (3mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico) y G5 (2mg.L<sup>-1</sup> de brasinolida) los cuales permitieron que los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz germinen a partir de los 6 días de introducidos en el medio. Los mejores medios para la inducción a callo embriogénico fueron I3 (4mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-dichlorofenoxiacético) los cuales fueron identificados por el ácido acetocarmín, protocolo descrito por Portillo (2000), el cual permite la observación de células somáticas.

### **ABSTRACT**

That is why this research is aimed, to generate viable seedlings in the laboratory, so it has established a protocol for *in vitro* germination and embryogenic callus induction of *Cedrela montana* Moritz ex Turcz from zygotic embryos, sort of interest to the Metropolitan District of Quito. From this project was able to establish appropriate means for disinfection were T2 which contains a concentration of 0.5% v / v sodium hypochlorite and T7 which corresponds to the use of

hydrogen peroxide at a concentration of 3% v / v of which inhibited the growth of exogenous fungi, bacteria and even better prevented necrosis of the embryos. At the stage of germination the best treatments were supplemented with G3 (3mg.l<sup>-1</sup> gibberellic acid) and G5 (2mg.l<sup>-1</sup> of brassinolide) which allowed the mature embryos of *Cedrela montana* Moritz ex Turcz germinating from 6 days of introduced into the medium. The best means of inducing embryogenic callus were I3 (4mg.l<sup>-1</sup> of 2.4-dichlorofenoxiacético) which were identified by the acetocarmine acid, protocol described by Portillo (2000), which allows the observation of somatic cells.

---

## INTRODUCCIÓN

Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad del continente y del mundo. En materia de plantas, cuenta con casi 25.000 especies diferentes en las distintas regiones del país. Parte de esta riqueza constituyen sus bosques, en los cuales crecen alrededor de 5000 especies de arbóreas.

A nivel del Distrito Metropolitano de Quito, podemos decir que posee un paisaje heterogéneo el cual es influenciado por su ubicación en el callejón interandino, entre los ramales de la cordillera occidental y oriental de los Andes, esta ubicación ha dado lugar a la formación de varios ecosistemas con diversas composiciones boscosas. De manera general la cobertura vegetal está confirmada por páramo, bosque natural (secundario y en buen estado), mosaicos de bosques con cultivo y pastizales, pastos, cultivos de ciclo corto y matorrales secos. Los bosques naturales representan la mayor

superficie del Distrito Metropolitano de Quito (17% del total del territorio del distrito), según información recolectada se estima que en el distrito existen 2330 especies de plantas vasculares. El 11% (254) del total registrado es endémico y 122 especies están en las siguientes categorías de amenaza: Peligro Critico, En Peligro y vulnerables, estando considerada como una planta vulnerable a cedro andino según la organización de los trópicos (MECN, 2010).

*Cedrela montana* es un forestal perteneciente a la familia de las meliáceas, es un árbol de lento crecimiento que alcanza de 25 a 30m de altura, tiene una corteza de color rosa. Las hojas son alternas compuestas y paripinnada con márgenes de conjunto. Estas especies crecen en suelos con buen drenaje, de textura arenosa con pH neutro o alcalino y de buena fertilidad. Los suelos con baja fertilidad provocan retrasos en el crecimiento. El cedro crece en zonas altas entre los 1600-2800 msnm, con temperaturas media entre 10 y 20°C y con

precipitaciones anuales de 500 a 2000mm y crece en bosques de montaña seca o en bosques húmedos. Las flores son terminales y pequeñas, el cáliz es regular y lobulado, los frutos son cápsulas leñosas las cuales contienen semillas aladas (Rodríguez, *et al.*, 2003).

Cedro, tiene una gran importancia en la carpintería, para exteriores e interiores y sobre todo para muebles debido a su color, también es caracterizado por su dureza y alta durabilidad (Rodríguez, *et al.*, 2003).

Una de las pérdidas debido a la explotación irracional de los bosques nativos es la reducción de fuentes de semillas de muchas especies forestales, lo cual dificulta su regeneración tanto natural como artificial. De todo el germoplasma que se produce anualmente en los bosques, las semillas son la fuente de reproducción más importante, debido a las ventajas y posibilidades de utilización que nos ofrecen (Ordoñez, *et al.*, 2004).

En los últimos años la biotecnología forestal ha tenido un desarrollo espectacular. En particular las técnicas de regeneración clonal de plantas basadas en técnicas de *cultivo in vitro*, fundamentalmente por vía de embriogénesis somática, se están ya aplicando por muchas empresas privadas e instituciones públicas a nivel semi-operativo

con diversas especies, para la conservación de material selecto y el establecimiento de ensayos clonales. (Celestino, *et al.*, 2001). Una de las técnicas más usadas para permitir la producción de embriones es la germinación, se llama germinación al acto por el cual la semilla en estado de vida latente entra de pronto en actividad y origina una nueva planta (González, *et al.*, 2000).

Para que el proceso de germinación, es decir, la recuperación de la actividad biológica por parte de la semilla, tenga lugar, es necesario que se den una serie de condiciones ambientales favorables como son: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y, una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos para el desarrollo de la plántula (González, *et al.*, 2000).

La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos, que incluyen la respiración, la síntesis proteica y la movilización de reservas. A su vez la división y el alargamiento celular en el embrión provocan la rotura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula (González, *et al.*, 2000).

Gracias a los avances tecnológicos como es el caso de la Biotecnología vegetal la

germinación de embriones se ha visto favorecida, ya que esta técnica *in vitro* permite el aislamiento de un embrión y su germinación *in vitro*, con el fin de obtener una planta viable, pudiendo tener varias utilidades como el acortamiento del ciclo de mejora, prevención de aborto embrionario, superación de la incompatibilidad, producción de haploides, entre otros. Ésta técnica es útil para inducir la germinación de semillas maduras en letargo, superando las restricciones ocasionadas por la cubierta de la semilla o del endospermo (Sánchez, *et al.*, 2004).

Otro método que puede usarse para propagar las plantas en masa es la embriogénesis somática. Como indica su nombre, esta técnica causa que se formen embriones generados desde el tejido en cultivo, proceso que por otra parte sólo ocurre en la formación de una semilla. Bajo el control de ciertas mezclas hormonales se forman los embriones dentro de una masa aparentemente desorganizada de un callo, en el cual nódulos de células comienzan a desarrollarse en forma que recuerda la estructura de un embrión de semilla. Si estos embriones se trasladan a otros medios, desde los callos, medios que están diseñados para permitir que el embrión germine, entonces desarrollará una estructura de planta completa, esto es una

plántula, un talluelo enraizado que no difiere mayormente de la obtenida desde semilla. Como las plantas obtenidas por caulogénesis axilar o adventicia, estas plántulas también pueden aclimatarse para transformarse en una planta viable con capacidad de fotosíntesis (Morgan, 2011).

La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénicos muy frecuentes en el cultivo *in vitro* de especies vegetales. La embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar al embrión zigótico sin que medie la fertilización de las gametas, mientras que por organogénesis pueden obtenerse tallos, raíces o flores. Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células, que según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división. En condiciones de cultivo *in vitro*, las células somáticas pueden regenerar embriones o brotes, raíces y/o flores como respuesta a un determinado estímulo. La regeneración es un proceso que comprende diferentes fases que se suceden de manera similar para los tres tipos de morfogénesis citadas. De Klerk y colaboradores en 1997 denominaron a estas diferentes fases como fase de adquisición de la competencia, fase de inducción y fase de realización (Radice, 2004).

En la fase de inducción, las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una relación directa entre el tipo, concentración y combinación de reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar. En la fase de realización, la célula sufre las sucesivas divisiones para formar el órgano determinado (Radice, 2004).

### METODOLOGÍA

Los materiales presentes en la metodología son los que se encuentran disponibles al momento en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos CIAC.

### PRE- GERMINACIÓN

Las semillas en el trabajo fueron proporcionadas por el Banco de Semillas del Vivero de Cununyacu, las mismas que fueron extraídas de árboles seleccionados por sus mejores características fenotípicas, fueron colocadas en agua destilada por dos días para su pre- germinación a temperatura ambiente.

### ETAPA DE DESINFECCIÓN

Para la etapa de desinfección se utilizó embriones zigóticos maduros sin testa, I se los dividió en grupos y se los colocó en los siguientes tratamientos:

Tratamientos	Concentraciones de Desinfectantes	
T1	0.25%	Hipoclorito de sodio
T2	0.50%	
T3	0.75%	
T5	1%	
T6	2%	Peróxido de Hidrógeno
T7	3%	

Éste material vegetal se lo colocó en los tratamientos por un tiempo de 10 minutos en agitación constante, luego se los llevó a una cámara de flujo laminar para realizar los lavados, luego fueron colocados en alcohol cuya concentración fue del 90% v/v por 30 segundos y se los enjuagó con agua estéril.

Las semillas una vez desinfectadas, se las colocó en medio básico de Murashige y Skoog (MS) al 100%, una vez introducidas se las llevó a la sala de incubación por seis días a oscuridad, a temperatura controlada, pasado este tiempo, se las colocó por un fotoperiodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad.

### ETAPA DE GERMINACIÓN

En ésta etapa se utilizó como agente desinfectante al peróxido de hidrógeno en concentración del 3% v/v.

Una vez realizada la desinfección de las semillas maduras de cedro se prosiguió a extraer el embrión para colocarlo en sus respectivos tratamientos. Los cuales estuvieron compuestos por:

Tratamientos	Composición del medio de cultivo
G1	1 mg*L <sup>-1</sup>
G2	2 mg*L <sup>-1</sup>
G3	3 mg*L <sup>-1</sup>
G4	1 mg*L <sup>-1</sup>
G5	2 mg*L <sup>-1</sup>
G6	3 mg*L <sup>-1</sup>
G7	5%
G8	10%
G9	15%

Medio Básico de Murashige y Skoog

Acido Giberelico  
Brasinolida  
Agua de Coco

Una vez realizada la introducción de los embriones en los tratamientos se los llevó a la sala de incubación a temperatura controlada por seis días de oscuridad, transcurrido este tiempo se las colocó en un fotoperíodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad hasta su germinación.

### ETAPA DE INDUCCIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO

En ésta etapa se utilizó como agente desinfectante al hipoclorito de sodio en concentración del 0.5% v/v.

Realizada la desinfección de las semillas de *Cedrela montana*, se prosiguió a extraer el embrión para colocarlo en sus respectivos tratamientos. Los cuales estuvieron compuestos por:

Tratamientos	Composición del medio de cultivo
I1	2 mg*L <sup>-1</sup>
I2	3 mg*L <sup>-1</sup>
I3	4 mg*L <sup>-1</sup>
I4	2 mg*L <sup>-1</sup>
I5	3 mg*L <sup>-1</sup>
I6	4 mg*L <sup>-1</sup>
I7	0,5 mg*L <sup>-1</sup> + 1 mg*L <sup>-1</sup>
I8	1 mg*L <sup>-1</sup> + 0.5mg*L <sup>-1</sup>
I9	1 mg*L <sup>-1</sup> + 1 mg*L <sup>-1</sup>

Medio Básico de Murashige y Skoog

2,4  
Ácido  
diclorofenoxiacético  
Ácido  
naftalenacético  
Combinado entre 2,4-D y ANA

Una vez realizada la introducción de los embriones en los tratamientos se los llevó a la sala de incubación a temperatura

controlada por dos meses a oscuridad, hasta la formación de callo.

En esta etapa se realizó un método de comprobación de los callos obtenidos a partir de la tinción del ácido acetocarmín protocolo descrito por Portillo (2000).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ETAPA DE DESINFECCIÓN

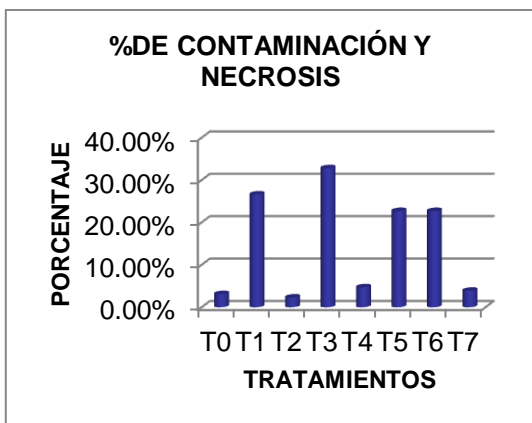
En esta etapa se utilizó dos tipos de desinfecciones los cuales fueron hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno, por medio de estos se logró controlar la proliferación de hongos y bacterias en los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, para ello se necesitó realizar pre ensayos para definir con que porcentajes de hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno empezar a trabajar durante el proyecto.

Se utilizó como agente desinfectante al hipoclorito de sodio, ya que en cultivo de tejidos es muy utilizado, porque proporciona la muerte de microorganismos infecciosos como bacterias y hongos exógenos, permitiendo que exista un mayor índice de establecimiento en el material vegetal, además de ser efectivo éste producto es más económico y fácil de adquirir (Borges *et al.*, 2009).

El hipoclorito de sodio, debe ser usado a ciertas concentraciones ya que éste es un desinfectante muy fuerte es por ello que AMexBio, describe que la concentración máxima que se requiere para desinfectar material orgánico es al 1% v/v de hipoclorito de sodio.

Durante el proceso de investigación, el uso de diferentes concentraciones fue uno de los principales retos durante este proceso, para el cual se inició con concentraciones bajas de hipoclorito de sodio como se mencionó anteriormente. Tras el análisis estadístico Anova para ver que tratamiento es el mejor, por medio de éste análisis se pudo identificar que los mejores tratamientos fueron T2 que contiene una concentración de 0.5% v/v de hipoclorito de sodio y T7 que corresponde al uso de peróxido de hidrógeno en concentración de 3% v/v.

Al evaluar el porcentaje de contaminación se puede establecer que los tratamientos T2 y T7 presentaron porcentajes del 2.3 y 3.7 % respectivamente siendo estos los mejores tratamientos para desinfectar embriones de *Cedrela montana*.



García *et al.*, (2008), explica que el uso de peróxido de hidrógeno como agente de desinfección da buenos resultados en semillas forestales. Esto se debe a que el  $H_2O_2$ , tiene más capacidad de oxidación que el cloro y que el dióxido de cloro, debido a sus fuertes propiedades oxidativas, por lo que se emplea como agente desinfectante (Sánchez, 2009).

Las moléculas del  $H_2O_2$ , son degradables en agua, ya que liberan oxígeno molecular y agua sin dejar residuos tóxicos. Este compuesto debe ser usado en concentraciones bajas ya que si se usa a concentraciones de 10% y 20% v/v este puede provocar quemaduras a los tejidos expuestos al  $H_2O_2$ , es por ello que en el proyecto se usó tratamientos con concentraciones de 1-3% v/v para verificar cual provoca la eliminación de microorganismos sin dañar los tejidos del embrión de *Cedrela montana* Moritz ex

Turcz, se conoce que este compuesto es bactericida, virucida y fungicida; para que este químico funcione efectivamente se necesita de un factor importante, la agitación, este factor asegura que exista un suministro de oxígeno adecuado (Sánchez, 2009).

Cuando se utiliza la agitación bajo la presencia de un desinfectante se reduce los grados de infección por microorganismos (Riofrío, 2004).

#### ETAPA DE GERMINACIÓN

En la etapa de germinación se usó peróxido de hidrógeno como agente desinfectante, ya que tiene un efecto de estimulación en la germinación de las semillas especialmente de especies forestales (García *et al.*, 2008), el uso de este compuesto se debe realizar a concentraciones del 1% v/v (Willan, 2012), durante el proyecto, la concentración de  $H_2O_2$  usada fue al 3% v/v, debido a que presentó mejor estabilidad en las semillas de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, esto se debe a que el peróxido de hidrógeno aumenta la permeabilidad del agua y oxígeno facilitando a nivel celular la oxidación de grasas y su conversión a carbohidratos, lo que promueve la activación de enzimas y reacciones sintéticas esenciales para la movilización de componentes celulares



involucrados en el crecimiento de la raíz (FAO, 2012).

Cuando se habla de germinación, se está refiriendo al proceso que sufren las semillas, el cual implica el aislamiento del embrión que se encuentran en estado de latencia y su posterior germinación todo esto de manera *in vitro*, con el fin de obtener una planta totalmente capaz de desarrollarse y realizar los procesos fotosintéticos, se realiza este proceso *in vitro* con el principal objetivo de acortar los ciclos de germinación y para rescatar material que esté en peligro de extinción o vulnerables como el caso de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Esta técnica es útil para inducir la germinación semillas en letargo, superando las restricciones ocasionadas por la cubierta de la semilla o por su endospermo (Sánchez *et al.*, 2004), en éste caso en *Cedrela montana* Moritz ex Turcz posee una testa muy fina pero su endospermo es grueso y es el que retarda su germinación lo cual provoca que este forestal empiece su ciclo a partir de los 15 a 30 días de su siembra, o a veces se interrumpe por completo el ciclo manteniéndolo en letargo permanentemente.

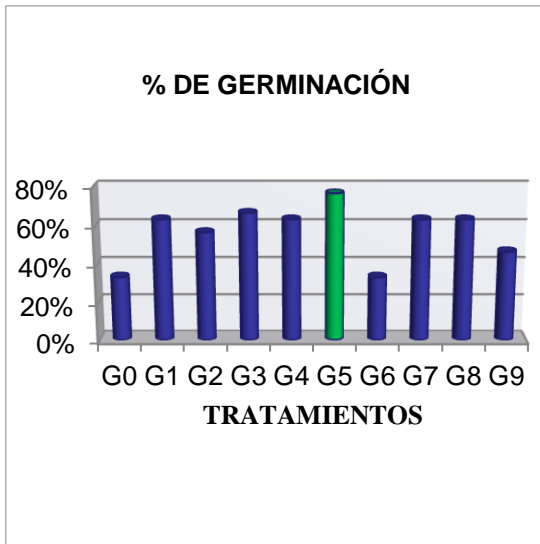
Dentro de ésta técnica es imprescindible saber el desarrollo de los embriones en el caso de la investigación se conoce que cedro andino posee una germinación de tipo

epigea, ya que con esto se puede determinar los requerimientos necesarios del medio de cultivo a utilizar.

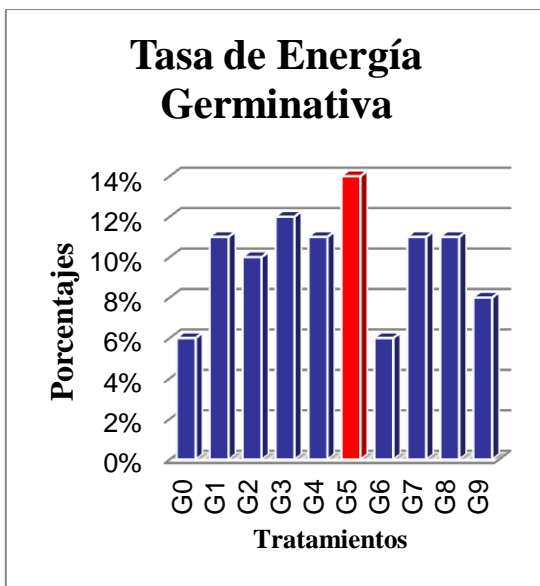
Uno de los medio de cultivo más conocidos hasta la actualidad, es el medio de Murashige y Skoog (MS), ya que este medio puede ser modificado según los requerimientos de los embriones, como por ejemplo: se puede modificar la concentración de sacarosa, concentración de hormonas vegetales e incluso vitaminas según las necesidades de cada especie (Roca *et al.*, 1991).

Es por ello que se ha usado como medio base al medio Murashige y Skoog (MS) al 100%, el cual fue suplementado con reguladores de crecimiento como el ácido giberélico (AG3), brasinolida (BRA) y agua de coco, los cuales mediante un análisis estadístico ANOVA para ver que tratamiento dio los mejores resultados se obtuvo que los tratamientos G3 (3mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico) y G5 (2mg.L<sup>-1</sup> de brasinolida) permitieron realizar la germinación a partir del día sexto de ser colocados en los medios de cultivo.

Tras un análisis de porcentaje de germinación y tasa de energía germinativa tenemos que los mejores tratamientos fueron:



En ésta grafica se puede observar que los mejores tratamientos son G3 y G5 ya que poseen un porcentaje de germinación igual a 67 y 77% respectivamente.



En éste cuadro se observa que los mejores resultados obtenidos para la tasa de energía germinativa corresponden al 12% de AG3 y 14 % de BRA, con esto se puede decir que

los tratamientos G3 ( $3\text{mg.L}^{-1}$  de ácido giberélico) y G5 ( $2\text{mg.L}^{-1}$  de brasinólida) han demostrado ser los mejores tratamientos, permitiendo

En ciertas investigaciones realizadas para la germinación *in vitro* para forestales, han utilizado al ácido giberélico como regulador de crecimiento en embriones maduros, permitiéndoles mejorar la energía germinativa de estas especies, ya que este fitorregulador es conocido como la principal hormona para inducir la germinación (Vidales, 2003).

En este forestal de cedro el ácido giberélico dio buenos resultados como se puede evidenciar, pero la cantidad de germinación no fue en un 100% es decir que se obtuvo pérdida de material, con lo cual se debe analizar si al medio MS suplementado con ácido giberélico se le debe adicionar otros componentes para que la germinación de esta semilla sea en un 100%.

En cambio la brasinólida conocida como BRA, es un regulador hormonal el cual ha sido utilizado en la micropropagación de especies forestales (Jordán, 2006) dando muy buenos resultados, pero en este caso tratándose de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, ésta hormona ha sido investigada en el proyecto para saber su efecto en la germinación el cual fue muy beneficioso ya que permitió los mejores resultados de

germinación, permitiendo obtener una planta completa es decir con hojas, tallos, raíz primaria y raíces secundarias bien definidas.

Mientras que el agua de coco es muy rico en nutrientes y su composición específica depende de la madurez del fruto, a menor madures mayor concentración de nutrientes éste producto contiene citoquininas que son las hormonas encargadas de promover la ruptura de la dormancia y la germinación de semillas además que estimulan la elongación de las células de los cotiledones (Quinto *et al.*, 2009), normalmente ésta agua deber ser esterilizada por medio de filtración ha sido benéfica en el cultivo de embriones (Roca *et al.*, 1991), en este caso durante la investigación el agua de coco fue autoclavado lo cual puede haber influenciado en el proceso ya que este producto no provocó ningún efecto en los embriones de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, en el estudio se puede evidenciar que el agua de coco solamente permitió que las semillas de cedro formaran la radícula más no permitió la germinación epigea esperada, se puede decir que este compuesto no es idóneo para este tipo de forestal.

El efecto de los reguladores vegetales en el crecimiento de embriones no es muy claro, pero se ha sugerido que el control hormonal se encuentra relacionado con el control físico

(Roca *et al.*, 1991). Es por ello que la germinación en los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, ha dado una planta físicamente idónea capaz de desarrollar sus estructuras principales como raíz principal y secundaria, un tallo cuyo tamaño es mayor a 1 cm y la formación de hojas verdaderas, permitiendo a cedro andino ser una planta capaz de realizar por sí sola las reacciones de fotosíntesis.

### ETAPA DE INDUCCIÓN A CALLO

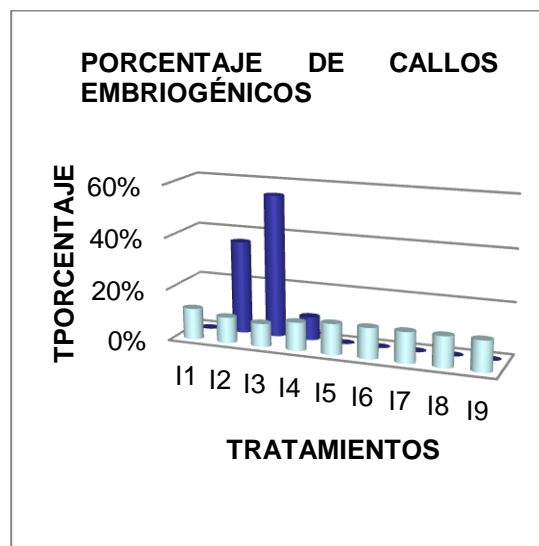
En ésta etapa de investigación se realizó la inducción a callo embriogénico de los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, para la desinfección de éste forestal se usó al tratamiento de hipoclorito de sodio con concentración del 0.5% v/v, el cual fue evaluado en la etapa de desinfección y arrojó los mejores resultados, como se mencionó anteriormente el hipoclorito de sodio es muy buen desinfectante ya que es muy fuerte y elimina a todo tipo de microorganismos, es por ello que se usó en esta etapa ya que se debía esperar un período de 60 días para ver resultados satisfactorios, mientras que el peróxido de hidrógeno mostró tener efecto desinfectante, pero los embriones empezaron a formar hongos pasado los 30 días de establecidos los tratamientos.

Como dijo Haberlandt en 1902 “Teóricamente todas las células vegetales son capaces de dar origen a una planta completa” (Roca *et al.*, 1991). Durante la inducción la porción de la planta donante cultivada *in vitro* cambia su patrón de expresión y genera embriones somáticos, en la mayoría de las especies la embriogénesis somática se obtiene a partir de embriones cigóticos inmaduros (Celestino *et al.*, 2001), en la presente investigación el uso de embriones inmaduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, no se llevó a cabo debido a la época en la que se inició el estudio, por ello se realizó con embriones cigóticos maduros de esta especie forestal.

La fase de inducción se ve relacionada directamente entre el tipo, concentración y combinación de reguladores de crecimiento agregados al medio de cultivo y al órgano a desarrollar. Es por ello que la organogénesis indirecta, está involucrada con el uso de ciertas hormonas, en algunas investigaciones han evidenciado que el uso de auxinas estimulan la iniciación del callo embriogénico (Litz, *et al.*, sin año), por lo que en la investigación fue llevada a cabo con el uso de auxinas como: ácido 2,4-dichlorofenoxiacético y ácido naftalenacético.

Durante el análisis ANOVA los resultados obtenidos fueron, que el mejor tratamiento

para inducir a callo es el tratamiento I3 (4mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-dichlorofenoxiacético) ya que produjo un 55% de callos los cuales fueron embriogénicos como se muestra en la figura.



Se dice que es embriogénico siempre y cuando presente ciertas características a nivel celular como una gran cantidad de ribosomas, citoplasma denso, un nucléolo agrandado y pequeños granos de almidón, estas células por lo general se agrupan y varían de tamaño (Radice, 2004).

En el caso de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz se obtuvieron callos embriogénicos que presentaron estas características a partir del tratamiento I3 (4mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-dichlorofenoxiacético), siendo capaz de realizar la división celular a partir de los embriones maduros de cedro andino como se observa en el gráfico.



Mientras que al usar ácido naftalenacético a diferentes concentraciones, y la combinación de 2,4-dichlorofenoxiacético y ácido naftalenacético no se obtuvo callos embriogénicos o se formaron callos pero no embriogénicos, esto se debe a que no todas las especies reaccionan de la igual manera así pertenezcan a la misma familia como en las investigaciones realizadas por Daquinta (2004), en cedro rojo.

La cantidad de callos formados con estos biorreguladores fue muy baja esto se debe a que no todas las especies pueden manifestarse con la presencia de auxinas para la división celular (Roca *et al.*, 1991) o se puede deber a otros factores que intervinieron en el desarrollo de los callos, como explica Radice (2004), el genotipo, el tipo de explante, condiciones físicas y químicas del cultivo.

Pero uno de los principales factores limitantes en la formación de callo embriogénico para *Cedrela montana* Moritz ex Turcz puede haber sido provocado por la

atmósfera gaseosa ya que como explica Radice (2004), está condicionada por el tipo y tamaño de envase seleccionado así como también el sistema de cobertura del mismo. En condiciones *in vivo* la atmósfera contiene 78 % de nitrógeno; 21 % de oxígeno y 0,035 % de dióxido de carbono. En cultivos *in vitro* se han registrado, además, etileno y otros compuestos hidrocarbonados.

Otro factor que pudo haber influenciado en la inhibición de callo, son las condiciones de luz ya que al estar los embriones sellados y bajo oscuridad permanente promueven la concentración de CO<sub>2</sub> y al existir una gran cantidad de dióxido de carbono puede ser tóxico para los embriones y la división celular (Radice, 2004), en el caso de éste estudio las condiciones de luz fue totalmente nula ya que se colocó a los embriones bajo la oscuridad total, por lo que pudo haber influenciado a una baja formación de callo embriogénicos de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Es por ello que se necesita investigar con que otros tipos de hormonas vegetales se puede fomentar a la división celular, algunos autores describen que los brasinoesteroides tiene la capacidad promover a la división celular (Jordán *et al.*, 2006).

**CONCLUSIONES**

Los embriones desinfectados con hipoclorito de sodio al 0.5 % v/v y con peróxido de hidrógeno al 3% v/v, presentaron un porcentaje de contaminación del 2.3% y 3.9% respectivamente, permitiendo la desinfección de los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, sin provocar pérdida de material para investigar. El uso de etanol al 90% por 30 segundos permitió aun más la desinfección de los embriones, eliminando mayor cantidad de bacterias y hongos lo cual facilitó el cultivo *in vitro* de los mismos.

La utilización de Brasinolida y Ácido Giberélico como biorreguladores en la etapa de germinación, permitió obtener un porcentaje de germinación del 67 y 77%, lo cual favoreció para la obtención de plantas completamente desarrolladas, con raíz primaria, secundaria, tallo y hojas, permitiendo ser una planta capaz de llevar a cabo su fotosíntesis.

La hormona brasinolida en presencia del medio básico Murashige y Skoog (1962), dio los mejores resultados en la elongación, formación de hojas y presencia de raíces en la etapa de germinación de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Los tratamientos G3 (3mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico) y G5 (2 mg.L<sup>-1</sup> de brasinolida) presentaron una energía germinativa del 12

y 14% respectivamente, lo cual permite que esta especie deje su estado de latencia a partir de los seis días de ser expuestos a estos biorreguladores.

En los tratamientos de inducción a callo embriogénico las concentraciones de 4 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D conocido como ácido 2,4-dichlorofenoxiacético, fueron las que presentaron una mayor inducción y proliferación de callo, a diferencia de los tratamientos que poseían ANA (ácido naftalenacético) y la combinación de las dos auxinas.

El color, el brillo y la uniformidad del callo, permiten distinguir a simple vista si es o no callo embriogénico, el color que permite saber que se está formando la embriogénesis es cuando presenta un callo de color verde o blanquecino pero siempre con presencia de brillo.

La tinción acetocarmín mostró que es una solución muy eficiente ya que con éste se distinguieron las células embriogénicas de los callos formados.

**BIBLIOGRAFÍA:**

Álvarez, Camila. (2011). *Hormonas Vegetales*. Extraído: 21 de Diciembre del 2011, de <http://mundodebiologos.blogspot.com/2011/03/hormonas-vegetales.html>

AMEXBiO. (2008). *Seguridad biológica*. Sociedad de Biología de México. Extraído: 28

de enero del 2012, de <http://seguridadbiologica.blogspot.com/p/asiociacion-mexicana-de-bioseguridad-ac.html>

Borges, G.M., Estrada, A.E., Pérez, R.I., Meneses, R.S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de dioscorea alata l, clon caraqueño. Revista colombiana de biotecnología. Universidad nacional de Colombia- vol. xi, núm. 2. pp. 127-135.

Borrajó, Celina. Ing. (2006). Manual técnico de plantaciones forestales. Argentina. Extraído: 21 de diciembre del 2011, de <http://www.pnuma.org/manualtecnico/pdf/59.pdf>.

Cárdenas, L. D & Salinas N. R. (Eds.). (2007). Libro Rojo de plantas de Colombia. Volumen 4. Especies maderables amenazadas: primera parte. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI – Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Pp-232.

Carrere, Ricardo. (1999). Deforestación y monocultivos forestales en Ecuador. Extraído el 27 de enero del 2011, de <http://www.wrm.org.uy/paises/Ecuador/venas.html>.

Castillo, Alicia. Msc. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Investigadora, Unidad de Biotecnología. INIA. Extraído: 2 de enero del 2011, de [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad\\_382.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf).

Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López- Vela, D., Jiménez, J., Legre, J., Vieira-Peixe, A., Zavattieri, A. & Toribio, M. (2001). La embriogénesis somática como vía de regeneración clonal de especies forestales mediterráneas. Extraído el 31 de marzo del 2011, de

<http://www.scielo.oces.mctes.pt/pdf/rca/v30n1/v30n1a51.pdf>.

Chávez, Lucia. (2004). La Germinación In Vitro una Alternativa para Obtener Explantes en Cactáceas. Departamento de Biología celular y genética. Facultad de Ciencias Biológicas UANL. Monterrey –México.

CORPEI. (2005). La oferta del Ecuador. Extraído el 31 de marzo del 2011, de <http://www.cccuenca.com.ec/descargas/indicadores/indicadoresmadera.pdf>.

Daquinta, Marcos. (2004). Formación de callos a partir de inflorescencias inmaduras en Cedro y Caoba híbrida. Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Cuba.

FAO, (2012). Guía para la manipulación de semillas forestales con especial referencia a los trópicos. Compilado por Willan. R, para el centro de semillas forestales de DANIDA.

García, Breijo., Santamarina, Siurana., Pilar, María., Caselles, Josefa y Francisco, José. (2006). Histología Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia.

García, F.A., Álvarez, M.J., Rodríguez de la O, J.L., Corona, A.A. (2008). Germinación in vitro de semillas de Nolina parviflora (h.b.k.) hemsl. Universidad Veracruzana, vol. 10. núm. 2. pp. 27-33.

García, J.M. (2002). Introducción al cultivo de Tejidos. Versión 1.11. Extraído; 21 de diciembre del 2011, de <http://histolii.ugr.es/jmgarcia/cultivos/cultivos.pdf>.

González, Ana María., Raisman, Jorge y Aguirre, Marisa. (1999). Hormonas de las plantas. Extraído: 21 de Diciembre del 2011, de

<http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intro/biol/auxinas.htm>.

González, Carlos., De Francesco, Virginia. (2000). Embrión y Plántulas de Monocotiledóneas y Dicotiledóneas. Trabajos Prácticos de Botánica. CNBA. Extraído: el 10 de mayo del 2011, de <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Trabprac/trab-prac.htm>.

Guerra, Darwin. (2009). Crecimiento inicial de cuatro especies forestales: Cedrela montana Moritz ex Turcz, Alnus acuminata Kuntz, Croton spp, y Pinus radiata D. Don, en y sin asocio con cultivos agrícolas, en el cantón Otavalo periodo 2008-2009. Facultad de ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Universidad Técnica del Norte.

Gutiérrez, Antonietta., Muñoz Tuesta, S. (2000). Avances en la transformación genética de especies maderables: Cedro (Cedrela odorata Linnaeus). Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.

Irizarry, Morales Juan. (2004). Las Semillas. Departamento de Tecnología agrícola. Universidad de Puerto Rico en Utuado.

Kómetter, Roberto. Sin año. Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies. Perú- ECOBONA. Extraído: 8 de marzo del 2012, de <http://es.scribd.com/doc/73036189/29/Cedro-de-altura-Cedrela>.

Ligia, Martha., Restrepo, Juan. & Toro, Murillo. (2011). Manejo de las semillas y la propaación de diez especies forestales del Bosque Andino. Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia-Corantioquia.

Loyola-Vargas, Víctor M., De La Peña, C., Galaz- Ávalos, R. M., and Quiroz-Figueroa, F. R. (2011). Plant Tissue Culture. Extraído: el 21 de marzo del 2011, de

<http://es.scribd.com/doc/36593191/Plant-Tissue-Culture>.

Martínez, Bou Daniel & Maier, Camila. (2012). El mundo de las plantas, Botanical on line.

Mauseth, J.D. (2003). Botany and Introduction to plant Biology. 3 era Edición. Massachusetts.

Mercedes, María., González, Ana María. (2008). Morfología de plantas vasculares. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

Ministerio del Ambiente. (2006). Ecuador Forestal. Extraído el 31 de marzo del 2011, de <http://ecuadorforestal.org/informacion-s-fe/ecuador-una-potencia-forestal/>.

Morgan, W.M. (2008). Cultivo de tejido vegetal. Traducción del trabajo del International Plant Laboratories, Baltonsborough, UK.

Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales (MECN). (2010). Áreas Naturales del Distrito Metropolitano de Quito: Diagnóstico Biotecnológico y Socio Ambiental. Secretaria del ambiente. Fondo Ambiental 2010.

Ordoñez, Luis., Arbeláez, María & Prado, Lenin. (2004). Manejo de Semillas Forestales Nativas de la Sierra del Ecuador y Norte del Perú. EcoPar- Fosefor- Samiri. Quito, Ecuador.

Portillo, Liberato. (2000). Plántulas de embriones somáticos de Agave tequilana Weber generadas en biorreactor (Orbitabion). Biotecnología Vegetal. Extraído: el 4 de mayo del 2011, de <http://www.modbioveg.go.to/>.

Prado, Lenin., Valdebenito, Hugo. (2000). Contribución a la fenología de especies forestales nativas Andinas de Bolivia y Ecuador. Fosefor. Quito- Ecuador. Programa



Andino de fomento de semillas forestales  
Cosude/Intercooperation. pp. 62-64.

PROMABOS. (2001). Árboles melíferos para reforestar. Extraído el 31 de marzo del 2011, de [http://www.bio.uu.nl/promabos/arbolesmeliferos/pdf\\_files/Cedro.PDF](http://www.bio.uu.nl/promabos/arbolesmeliferos/pdf_files/Cedro.PDF).

Quinto, L., Martínez P, A., Hernández, L., Pimentel, Bribiesca., Rodríguez D, A., Trejo. 2009. Alternativas para mejorar la germinación de semillas de tres árboles tropicales. Universidad Autónoma Chapingo. MÉXICO.

Radice, Silvia. (2004). Morfogénesis in vitro. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Extraído: el 10 de mayo del 2011, de <http://www.biblioteca.org.ar/libros/150404.pdf>.

Riofrío, M. (2004). Growing peppers in the homegarden. Chile. Extraído: 29 de enero del 2012, de [www.q6csy.net/chile/growing.htm](http://www.q6csy.net/chile/growing.htm).

Roca, W. & Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Colombia: CIAT. p. 296-299.

Rodríguez, J., Nieto, V. (2003). Cedrela montana Moritz ex Turcz. Corporación Nacional de Investigación Forestal. Bogotá-Colombia. Extraído: el 21 de marzo del 2011, de <http://es.scribd.com/doc/22409704/Caracteristicas-Cedrela-Montana>.

Rostk. (1997). Tipos de germinación de "Plant Biology". Wadsworth Publishing Company.

Sánchez & J.M. (2004). Producción de bioinsecticida a base de bacillus thuringiensis; mini revisión. Extraído: 3 de enero del 2012, de <http://monografias.com/trabajos15/bioinsecticida/bioinsecticida.shtml>.

Sánchez, Manuel., Ríos, D., Pedraza, M., Pereira, G., Castellanos, H., y Escobar, R. (2004). Propagación in vitro de Nothofagus procera (Poepp. ET Endl.) Oerst. a partir de embriones aislados. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Chile.

Segretín, María Eugenia. (2004). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). INGENBI-CONICET - Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA. Extraído: 21 de diciembre del 2011, de <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euqe.pdf>.

Stern, K.R, Jansky S,y Bidlack, J.E. (2003). Introductory plant biology. 9<sup>th</sup> ed. Boston. McGraw- Hill.

Trujillo, Enrique. Msc. 2011. Cedro de Altura, Uno de los gigantes forestales de América. Extraído: 10 de marzo del 2012, de [www.revista-mm.com](http://www.revista-mm.com).

Vidales, Martín. 2003. Regulación hormonal en las plantas. Función de relación en el reino Metafitas. Biología y Geología. Argentina.

