

Efecto de la revigorización en el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Cedrela odorata* L.

Felipe Jiménez-Terry*, Raúl Barbón, Mariana La O, Martha Pérez, Raúl Collado, Mayra Acosta-Suárez, Yelenys Alvarado-Capó, Daniel Agramonte. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba CP 54 830. e-mail: felipe@ibp.co.cu

RESUMEN

El siguiente trabajo se desarrolló con el objetivo de disminuir la contaminación microbiana e incrementar la supervivencia *in vitro* de ápices y segmentos nodales de Cedro (*Cedrela odorata* L.). Para ello se efectuó la revigorización de las plantas madre. Se colectaron en diferentes periodos de tiempo estaquillas de 1-2 cm de diámetro y 25 cm de longitud las cuales se plantaron en una casa de cultivo. Se aplicaron soluciones con reguladores del crecimiento para evaluar su efecto sobre la brotación, crecimiento de los brotes y el enraizamiento. Se tomaron los brotes jóvenes emitidos por las estaquillas que recibieron tratamiento con fungicidas para disminuir la contaminación *in vitro* y se compararon con los ápices y segmentos nodales colectados directamente de las plantas de campo y de la casa de cultivo, que no recibieron tratamiento con fungicidas. Se realizó la desinfección de estos explantes con hipoclorito de sodio (NaClO) y fueron colocados en un medio de cultivo con 6-BAP 0.25 mg.l⁻¹ y AIA 0.125 mg.l⁻¹. La aplicación de sustancias estimuladoras incrementó la brotación y el crecimiento de las yemas axilares y la emisión de raíces de las estaquillas. Se logró un 84% de supervivencia y 10% de contaminación de los explantes con la desinfección durante 10 minutos por inmersión en NaClO al 1.5%. Se demostró la necesidad de realizar la revigorización del material vegetal para lograr el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de cedro.

Palabras clave: contaminación, desinfección, explantes, segmentos nodales, yemas axilares

ABSTRACT

The current research was developed with the objective to decrease the microbial contamination and to increase the survival *in vitro* of cedar (*Cedrela odorata* L.). Reinvigoration of mother plants was carried. Sticks of 1-2 cm of diameter and 25 cm of length collected in different periods of time were planted in a greenhouse. Growth regulator solutions were applied to evaluate sprouting, and growing of shoots and rootening. New shoots, sprayed with fungicide to eliminate *in vitro* contamination, were compared with apexes and nodal segments, without fungicide treatment, that were collected directly from field and the green house. Explants were disinfected with sodium hypochlorite (NaClO) to avoid contamination and placed in culture medium with 6-BAP 0.25 mg.l⁻¹ and AIA 0.125 mg.l⁻¹. The use of growth stimulating substances increased sprouting and growing of axillary buds, and rooting of sticks. A n 84% of survival and 10% of contamination were achieved with disinfection by immersion of explants during 10 minutes in NaClO 1.5%. The necessity of reinvigoration of starting material to achieve *in vitro* establishment of cedar nodal segments was demonstrated.

Key words: nodals segments, axillary buds, disinfection, explants, contamination

INTRODUCCIÓN

Cedrela odorata L. posee una alta demanda en los trópicos americanos debido al valor de su madera, a su apariencia atractiva, y a sus adecuadas propiedades físico mecánicas. Esta especie fue incluida en la lista de especies de prioridad, debido a la creciente escasez y el excesivo consumo (Da Costa *et al.*, 2003). La propagación convencional de este maderable está afectado principalmente por los daños que provoca el insecto *Hypsipyla grandella* Zeller. Las afectaciones ocurren tanto en la etapa de vivero, como durante su adaptación y crecimiento en el campo. El mismo taladra los tallos de las plantas jóvenes y limita su posterior desarrollo (Martínez, 2007). En la búsqueda constante de resistencia a este insecto se realizan

estudios para obtener una metodología eficiente de propagación y establecer un protocolo de transformación genética por biotecnología. Las investigaciones relacionadas con la micropropagación de esta especie han presentado como principales problemas: la contaminación de las yemas apicales y segmentos nodales colectados directamente de los árboles élites, la hiperhidricidad, la poca disponibilidad de los explantes, la sensibilidad a la desinfección y la baja o lenta brotación conjuntamente con la edad de las plantas madre.

La revigorización es una vía factible que permite la manipulación del potencial en las especies leñosas en función de preparar las plantas donadoras para el establecimiento *in vitro* y disminuir la

contaminación por microorganismos de los explantes iniciales (Pacheco, 1995). Tomando en consideración lo antes expuesto, este trabajo tuvo como objetivo: evaluar el efecto de la revigorización en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Cedrela odorata* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones generales

Se utilizaron árboles de 10 años de cultivo, altura de 6 m y 70cm de grosor del tallo como promedio, los mismos pertenecían al banco de semilla de la Empresa Provincial Forestal Integral de Villa Clara. Se les realizó la poda de la zona media de la copa, para obtener brotes jóvenes. Se efectuaron cinco riegos diarios de tres minutos de duración cada tres horas mediante microaspersores de dos atmósferas de presión con una entrega de $0.6 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$. La intensidad de la iluminación en la casa de cultivo se reguló mediante una malla plástica negra con orificios de 0.01 cm^2 , que deja pasar el 50% de la luz solar y con el cual se alcanzaron valores entre $83.5 - 106.2 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$. Estas condiciones fueron similares al protocolo descrito por Pérez *et al.* (2004).

Revigorización de estaquillas en casa de cultivo

Se definieron tres periodos para coleccionar estaquillas de Cedro de los árboles donadores de acuerdo con los promedios anuales de las variables climáticas: precipitaciones y temperaturas diarias. El primero:

- Noviembre–Marzo, con bajas temperaturas ($16-24^\circ\text{C}$) y escasas precipitaciones; el segundo.
- Abril–Julio, que comienza con temperaturas medias ($24-28^\circ\text{C}$) y culmina con altas temperaturas ($28-34^\circ\text{C}$) e intensas precipitaciones; y el tercero.
- Agosto–Octubre, que comienza con altas temperaturas y finaliza con temperaturas medias.

Las estaquillas se colectaron 10 días después del inicio del mes, a partir de ramas ligeramente leñosas de 40 cm de largo. Se realizó una colecta por mes; cinco en el primer periodo, cuatro en el segundo y tres en el tercero; para un total de 12 en el año. Después de cortar las hojas totalmente, las estaquillas se plantaron en la casa de cultivo en bolsas de 12 cm de alto, 7cm de diámetro y 500 cm^3 de capacidad con un sustrato que contenía humus de lombriz + zeolita en proporción (3:1). Las características de las estaquillas fueron: longitud de 20 - 25 cm, diámetro 1.5 - 2 cm, cinco entrenudos. A los 60 días de cultivo se realizó el conteo del número de brotes por estaquilla (brotes mayores de 1cm de longitud) y el conteo del número de estaquillas vivas. Con estos valores se

determinó el porcentaje de brotación y supervivencia (%).

Estimulación del crecimiento de las estaquillas en la casa de cultivo

Se utilizaron las dos soluciones estimuladoras descritas por Posada-Pérez *et al.* (2004) y se definieron cuatro tratamientos: en el primero, se realizó la inmersión de la zona basal de 50 estaquillas en una bandeja plástica de 3 litros de capacidad, durante 10 minutos con la solución con Acido naftalenacético (ANA - 10 mg l^{-1}) + Biobras - 6 (BB-6 - 0.5 mg l^{-1}) + (agua desionizada). En el segundo tratamiento, se realizaron aspersiones foliares semanalmente a partir de los 7 días de plantadas las estaquillas con una solución que contenía 6-bencilaminopurina (6-BAP) ($500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) + ácido giberélico (AG_3) ($1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) + agua desionizada. En el tercero se aplicó la combinación de los tratamientos 1 y 2. Además, se estableció un tratamiento control (4) sin aplicación. A los 60 días de cultivo, se realizó el conteo del número estaquillas brotadas y se determinó el porcentaje de brotación (%), además, se realizó el conteo de estaquillas vivas y se determinó el porcentaje de supervivencia de las estaquillas (%) y se evaluó la longitud de los brotes (cm).

Aplicación de fungicidas a las plantas donadoras de *Cedrela odorata* L.

A los 40 días de establecidas las estaquillas en la casa de cultivo; se realizaron aplicaciones de fungicidas (Benomil, Mancozeb y Silvacur Combi) en rotación cada cuatro días durante tres semanas. Por otra parte se seleccionaron plantas donadoras de campo y estaquillas en la casa de cultivo, que en ambos casos no recibieron aplicaciones de fungicidas. De estos tres tratamientos se tomaron segmentos nodales (explantes) que se desinfectaron con Hipoclorito de sodio 1.5% durante 10 minutos. Los mismos se cultivaron *in vitro* en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS), al cual se le redujeron los nitratos a la mitad y se le adicionó tiamina $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, mio-inositol $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ y sacarosa 2%. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 y fue solidificado con $2.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de Phytigel. Su esterilización se realizó en autoclave a 121°C de temperatura y $1.2 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ de presión durante 20 minutos. Se utilizaron 50 tubos de ensayo (réplicas por tratamiento) de 50 ml de capacidad con 10 ml de medio de cultivo y se colocó un explante en cada uno. Los mismos se situaron en una cámara de crecimiento con luz solar, 28°C y $47.5 - 62.3 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$. A los 10 días de cultivo se evaluó el número de explantes contaminados con microorganismos y el número de explantes vivos y se determinó el porcentaje de contaminación y supervivencia (%).

Desinfección y establecimiento *in vitro* de los explantes de *Cedrela odorata* L.

Se cortaron segmentos nodales de 2cm de longitud con una yema axilar latente en la base de la hoja de las estaquillas revigorizadas que recibieron tratamientos con las dos soluciones estimuladoras y aplicaciones con fungicidas en la casa de cultivo. Los mismos se desinfectaron con tres concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) 1.0, 1.5% y 2.0%, combinadas con tres tiempos de exposición (5, 10 y 15 minutos); las cuales constituyeron los tratamientos de este experimento. Estos explantes se cultivaron en el medio de cultivo y condiciones similares al experimento anterior. A través del conteo del número de explantes contaminados con microorganismos y vivos, se determinó el porcentaje de explantes contaminados (%) y el porcentaje de supervivencia (%). Posteriormente, a los 35 días de cultivo se efectuó el conteo de explantes brotados y se determinó el porcentaje en estas variables.

Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 15.0. Las diferencias entre las medias fueron determinadas mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan para el 5% en las variables paramétricas y Mann Whitney para análisis estadísticos no paramétricos. En las variables donde se calcularon porcentajes se aplicó la prueba de análisis de proporciones (ANDEVAP).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Revigorización de estaquillas en casa de cultivo

En el periodo de Abril-Junio se lograron los mejores resultados en todas las variables evaluadas y se obtuvo el mayor porcentaje de estaquillas brotadas (32.4%) con diferencias significativas de en comparación con los restantes periodos. De otra parte, las estaquillas colectadas en el periodo de Septiembre – Noviembre, también presentaron

diferencias estadísticas con las colectadas en el periodo Enero – Marzo (Tabla 1).

La supervivencia fue mayor en el periodo de Abril- Junio, sin diferencias significativas con el periodo de Septiembre –Noviembre. El periodo Enero – Marzo presentó una supervivencia y brotación de las yemas axilares inferiores a los restantes, lo que pudo estar relacionado con las bajas temperaturas y escasas precipitaciones. Las plantas en estas condiciones climáticas se encuentran en una etapa de acumulación de sustancias de reserva. Rodríguez *et al.* (1999) hicieron referencia a estos aspectos fisiológicos relacionados con la revigorización de plantas madre en condiciones semicontroladas al señalar la dependencia del crecimiento de las plantas con los periodos climáticos; principalmente la influencia de la temperatura. Mroginski *et al.* (2004) plantean además, que la época del año en la que se colectan los brotes es un factor importante que está asociado al grado de dormancia que presentan las yemas axilares.

Estos resultados demostraron la influencia de la época de colecta en la revigorización del material vegetal. En el periodo lluvioso de Abril a Junio se logra el rejuvenecimiento natural de las plantas relacionado con los cambios de temperatura, humedad relativa y luminosidad; principalmente después de un periodo de bajas temperaturas, sequía y corta duración de la iluminación solar (Pacheco, 1995). Este efecto de la época sobre el rejuvenecimiento de las plantas ha sido descrito por Rodríguez (1999) cuando señaló la importancia de este factor en las bases fisiológicas de la revigorización vegetal. Refiere además, que después de determinados periodos naturales de dormancia de las yemas axilares; la brotación y el crecimiento de las mismas está determinado por cambios de temperatura y humedad relativa en el ambiente, que ejercen un papel fundamental en la activación hormonal de las plantas después de un periodo de acumulación de sustancias en los tejidos de las plantas. Olmos *et al.* (2004) recomiendan colectar explantes durante la estación primeveral y estival, cuando existe una brotación activa de las yemas.

Tabla 1. Influencia de la época de colecta de estaquillas de *Cedrella odorata* a partir de árboles adultos en la brotación y supervivencia de estas en casa de cultivo.

Tratamientos (Época de colecta)	Brotación (%)	Supervivencia (%)	Número de Brotes por estaquilla (u)
Sept – Nov	26.2 b	25.7 b	1.7 b
Enero – Marzo	13.7 c	10.3 c	0.2 c
Abril – Junio	34.5 a	32.6 a	3.5 a
± EE	± 1.83	± 2.481	± 0.233
CV (%)	16.79%	14.32%	20.15%

Medias con letras distintas en las variables que describen unidades en una misma columna, se corresponden con diferencias significativas ($P \leq 0.05$) según prueba de Mann - Whitney.

Estimulación del crecimiento de las estaquillas en la casa de cultivo

En la tabla 2 se puede apreciar que los mejores resultados en este experimento se obtuvieron con el tratamiento 3 en el cual se combina la aplicación de dos soluciones estimuladoras que contienen auxina (ANA), citoquinina (6-BAP), giberelina (AG_3) y brasinoesteroide (Biobras-6). De forma particular las soluciones aplicadas por separado (tratamientos 1 y 2) también ejercen efecto estimulador de la brotación y el crecimiento de los brotes de las estaquillas. Estos tratamientos difieren del control en el porcentaje de brotación de las estaquillas y la longitud de los brotes. Los resultados reflejan que en el tratamiento 3 se obtiene el efecto sinérgico de la aplicación de las soluciones individuales en los tratamientos 1 y 2 para las variables emisión de raíces, brotación de las estaquillas y longitud de los brotes. Para el porcentaje de supervivencia no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Con estos resultados observó que la aplicación de estas soluciones no determinó la supervivencia de las estaquillas pero sí tuvo un efecto estimulador de la brotación, emisión de raíces y crecimiento de los brotes.

Este comportamiento del enraizamiento, brotación y crecimiento de los brotes en la revigorización de las estaquillas en la casa de cultivo se fundamenta en lo planteado por Vázquez y Torres (1995) y Collado *et al.* (2004); los cuales señalan, que las plantas alcanzan un adecuado balance hormonal endógeno de forma natural, sin embargo cuando se aíslan tejidos para cultivarlos en condiciones artificiales; la acción exógena de reguladores del crecimiento puede acelerar estos procesos. En este caso se observó que el 6-BAP incrementó el porcentaje de brotación de las estaquillas debido a su efecto estimulador de la división celular. Asimismo, el ANA + brasinoesteroide (Biobras-6) estimularon la emisión de raíces y el crecimiento de los brotes

conjuntamente con el ácido giberélico y el 6-BAP. Jiménez *et al.* (2002) se refieren al efecto estimulador del Biobras-6 en el crecimiento de plantas *in vitro* de plátanos y describen que el tratamiento de inmersión de las raíces en este brasinoesteroide incrementó la longitud, la emisión de raíces y el número de hojas. Por su parte, Posada-Pérez *et al.* (2004) obtuvieron un mayor número de brotes en plantas donadoras de papaya (*Carica papaya* L.) cuando realizaron aplicaciones foliares de 6-BAP (500 mg.l⁻¹) + AG_3 (1g.l⁻¹). Al parecer no es suficiente la cantidad endógena de las auxinas y citoquininas en las yemas axilares de las estaquillas. Según Jiménez (1998), la aplicación exógena de estos reguladores puede compensar los efectos inductores sobre la brotación y el crecimiento de las yemas axilares que se encuentran en reposo. Un adecuado balance hormonal es indispensable para la diferenciación de las yemas axilares.

Aplicación de fungicidas a las plantas donadoras de *Cedrela odorata* L.

La aplicación de fungicidas a los brotes de las estaquillas en la casa de cultivo durante la revigorización de este material vegetal, ejerció un papel determinante en la disminución de la contaminación *in vitro* de los explantes y por ende, se logró mayor supervivencia. Los explantes tomados directamente de campo se contaminaron en su totalidad. Aunque la contaminación de los explantes que no recibieron tratamiento con fungicidas en la casa de cultivo fue alta, fue menor que los colectados de campo; lo que demuestra el efecto de revigorización del material vegetal con disminución de la contaminación por el cultivo en condiciones semicontroladas (Tabla 3). Según Xavier *et al.* (2003), las casas de cultivo constituyen instalaciones ideales para aislar las plantas del ambiente natural y disminuir las afectaciones provocadas por diferentes microorganismos contaminantes. Los productores tienen un mayor control sobre los factores biológicos mediante el diseño ambiental de la instalación.

Tabla 2. Resultados del enraizamiento, brotación y longitud de los brotes de estaquillas de *Cedrela odorata* revigorizadas en la casa de cultivo mediante aplicación de soluciones estimuladoras.

Tratamientos	No. estaquillas con raíces (u)	Brotación (%)	Supervivencia (%)	Longitud de los brotes (cm)
Solución 1	26.5	59.8 c	37.9 b	3.9 b
Solución 2	29.4	69.7 b	31.1 c	4.1 b
Solución 3 (1+2)	28.8	72.3 a	42.1 a	4.8 a
Control	28.2	61.4 c	30.2 c	3.2 c
± EE	± 0.54	±1.14	±1.1	± 0.23
CV	21.26%	15.35%	19.43%	10.29%

Medias con letras distintas en las variables que describen unidades y (cm) una misma columna, corresponden a diferencias significativas ($P < 0.05$) según prueba de Mann – Whitney y medias con letras desiguales de las variables referidas a porcentajes en una columna difieren estadísticamente según ANDEVAP ($p < 0.05$) y Según la prueba de rangos múltiples de Duncan para ($p < 0.05$). EE – error estándar, CV- Coeficiente de variación.

La contaminación fúngica es uno de los principales problemas durante la fase de establecimiento *in vitro*. Uno de los procedimientos para disminuir los riesgos de la contaminación en esta fase es la aplicación de fungicidas durante el ciclo de crecimiento de las plantas donadoras (Alvarado-Capó, 1998).

Acosta-Suárez *et al.* (2005) se han referido a la necesidad de aplicar un plan de defensa fitosanitario con fungicidas, a plantas leñosas antes del establecimiento *in vitro* como una vía eficiente para disminuir la contaminación fúngica y aumentar la supervivencia. Señalan además, que es necesario determinar en primer lugar la microbiota epífita presente en las plantas, de las cuales se tomarían los explantes iniciales para la micropropagación de la especie leñosa.

Desinfección y establecimiento *in vitro* de los explantes de *Cedrela odorata* L.

El tratamiento 5 (NaClO al 1.5 %) con un tiempo de exposición de los explantes durante 10 minutos alcanzó el valor máximo de supervivencia y un bajo porcentaje de contaminación solo inferior a los tratamientos 6, 8 y 9; que presentaron afectaciones por necrosis de los explantes (Tabla 4). Existió interacción entre la concentración del hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición de los explantes que se observa en los valores obtenidos por los tratamientos para cada una de las variables. La brotación como aspecto de mayor importancia, se vio favorecida en el tratamiento 5, lo que permitió definir el mismo como el más efectivo en la desinfección. La concentración de 2% produjo necrosis de los explantes, asimismo

ocurrió con el tiempo de desinfección que afectó la brotación y produjo necrosis a los 10 y 15 minutos de exposición con NaClO al 2%.

Villalobos (1992) en el cultivo del Lirio (*Eucharis amazonica*) con el uso de NaClO al 3.0 % y un tiempo de exposición de 20 minutos obtuvo resultados satisfactorios. Asimismo, Quiala *et al.* (2004) destacaron que durante el establecimiento *in vitro* de la especie endémica en peligro de extinción, *Eugenia squarrosa*, el empleo de una solución de NaOCl al 2.0% durante 20 minutos permitió el establecimiento del 100% de las semillas. Rodríguez *et al.* (2003) describen bajos índices de contaminación en el establecimiento de ápices de *Cedrela odorata* y *Swietenia mahagoni* con NaClO al 2% y 20 minutos de inmersión de los explantes. Por su parte, Martínez (2007) logró reducir la contaminación *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vellozo cuando empleó hipoclorito de sodio en la desinfección de los rebrotes de esta especie.

El establecimiento de yemas apicales y segmentos nodales de cedro colectados de plantas revigorizadas en casa de cultivo es la etapa inicial para la micropropagación de esta especie y un paso muy importante en la confección de una metodología eficiente para la propagación de híbridos o plantas transformadas de *Cedrela odorata*, esta herramienta es de trascendencia vital en los estudios de transformación genética de este maderable para la resistencia a *Hipsipyla grandella*. En este trabajo se logró el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de Cedro a partir de plantas revigorizadas en casa de cultivo (Figura 1).

Tabla 3. Influencia de la aplicación de fungicidas en fase 0, sobre la contaminación *in vitro* de yemas axilares de *Cedrela odorata* L. en la fase de establecimiento.

Tratamientos	Contaminación microbiana (%)	Supervivencia <i>in vitro</i> (%)
Aplicación de fungicida en la casa de cultivo	19.5 a	17.4 a
Control (Casa de cultivo sin aplicación de fungicida)	63.8 b	2.7 b
Control (directamente de campo sin aplicación de fungicida)	100 c	0 c
± EE	9.71	0.85
CV (%)	± 20.45	± 23.24

Medias con letras desiguales en una columna difieren estadísticamente según ANDEVAP ($p < 0.05$) y Según la prueba de rangos múltiples de Duncan para ($p < 0.05$). EE – error estándar, CV- Coeficiente de variación.

Tabla 4. Influencia del hipoclorito de sodio y el tiempo de desinfección en la contaminación y supervivencia *in vitro* de yemas apicales y segmentos nodales de Cedro.

Tratamientos		Contaminación	Supervivencia	Necrosis	Brotación
NaClO (% i.a)	Tiempo (min)	(%)	(%)	(%)	(%)
1.0	5	98 e	2 f	0 a	1 e
1.0	10	90 e	10 e	0 a	4 d
1.0	15	56 d	44 d	0 a	9 b
1.5	5	42 cd	58 bc	0 a	11 b
1.5	10	16 b	84 a	0 a	17 a
1.5	15	10 b	79 ab	11 b	8 bc
2.0	5	33 c	67 b	0 a	15 a
2.0	10	11 b	71 ab	18 b	10 b
2.0	15	0 a	56 c	44 c	6 cd
	± EE	± 2.76	± 2.42	± 3.08	± 2.19
	CV	18.65%	15.39%	20.44%	22.57%

Medias con letras desiguales en una columna difieren estadísticamente según ANDEVAP ($p < 0.05$) y Según la prueba de rangos múltiples de Duncan para ($p < 0.05$). EE – error estándar, CV- Coeficiente de variación.



Figura 1. Brotación *in vitro* de segmentos nodales de Cedro en la fase de establecimiento.

Kurtela *et al.* (2001) se refieren a la revigorización como una herramienta muy útil para la obtención de material vegetal nuevo en plantas leñosas y Rodríguez *et al.* (1999) plantean la necesidad de realizar la revigorización de las plantas donadoras como única vía para disminuir la contaminación microbiana en el establecimiento *in vitro*.

REFERENCIAS

- Acosta-Suárez, M, Alvarado Y, Cruz, M, Leiva M y Delgado L (2005) Micobiótica epifítica y contaminantes fúngicos del establecimiento *in vitro* de *Eucalyptus grandis*. Manejo integrado de Plagas y agroecología. 75: 60-63
- Alvarado-Capó, Y (1998) Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez, JN (Ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp. 81-104. IBP. Santa Clara
- Collado, R, Barbón R, Agramonte, D, Jiménez, F, Pérez, M, Gutiérrez O, Ramírez D (2004) Establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Swietenia macrophylla* King. Biotecnología Vegetal 4 (3): 143-146
- Da Costa-Nunes, E, Benson EE, Oltramari AC, Sibila Araujo, P, Righetto Moser, J, Viana AM (2003) *In vitro* conservation of *Cedrelinga fisilli* Vellozo (Meliaceae) a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. Biodiversity and Conservation. Springer 12 (4): 837-848
- Jiménez, E (1998) Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez, JN (Ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp. 13-24. IBP. Santa Clara
- Kowalski, B, Jiménez, F, Jomarrón, I, Agramonte, D, Coll F (2003) Efecto de tres análogos de brasinoesteroides sobre caracteres morfológicos y fisiológicos de vitropintas de papa c.v. Desireé, *in vitro* y en invernadero. Biotecnología Vegetal 3 (2): 115-118
- Kurtela, M, Siftar, A, Vrsek I, Karlovic K (2001) Effect of growth regulator on adventitious rooting of *Corylus colurna* L. En: Salas,

- P (Ed.) Proceedings of 9th International Conference of Horticulture, Lednice, Czech Republic, September 3 – 6
- Martínez, ME (2007) Establecimiento y multiplicación *in Vitro* de *Cedrela fissilis* Vellozo. Tesis de Maestría. 60 p. UNAM, Misiones.
- Mroginski, L, Sansberro, P, Flaschland, E (2004) Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Echenique, V, Rubinstein, C, Mroginski, L (Eds) Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, pp. 35-42. Ediciones INTA. Buenos Aires.
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Olmos, S, Luciani, G, Galdeano, E (2004) Micropropagación. En: Echenique, V, Rubinstein, C, Mroginski, L (Eds) Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, pp. 163–172. Ediciones INTA. Buenos Aires.
- Pacheco, J (1995) Revigorización de material adulto de *Pinus nigra* Arn: Criterios morfológicos y moleculares. 185 p Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de Oviedo, Oviedo, España.
- Pérez J, Mesén F, Hilje L, Aguilar ME (2004) Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Optimización de la fase de multiplicación. *Revista Forestal Centroamericana. Comunicación Técnica.* San José. Costa Rica.
- Posada-Pérez, L, Gómez; R, Gallardo, J, Reyes M, Herrera I (2004) Establecimiento *in vitro* de ápices de plantas de campo del híbrido cubano de Papaya IBP42-99. *Biotecnología Vegetal* 4 (3): 153-158
- Quijala, E, Montalvo G, Matos J, Mederos R, De Feria M, Chávez M, Capote A, Pérez N (2004) Establecimiento *in vitro* de *Eugenia squarrosa*: una especie endémica de Santa Clara (Cuba) en peligro de extinción. *Biotecnología Vegetal* 4 (1): 49-53
- Rodríguez, R (1999) Bases fisiológicas del envejecimiento y revigorización vegetal. Libro de reportes cortos. En: IV Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba. pp. 9-13
- Rodríguez, R, Daquinta M, Capote I, Pina D, Lescano Y, González-Olmedo J (2003) Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahagani* (Caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (cedro). *Cultivos Tropicales* 24: 23-27
- Vázquez E, Torres S (1995) Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación. Segunda edición. Ciudad de la Habana
- Villalobos, A (1992) Micropropagation of selected root crop, Lirio (*Eucharis amazonica*). *Tissue cultural applied to ornamental species* 9: 155-164
- Xavier, A, Santos GA, Oliveira ML (2003) Rooting of stem and leaf minicuttings in the vegetative propagation of Cedro-rosa (*Cedrela fissilis*). *Revista rvore*