

Aplicación de técnicas de micropropagación en la especie *Cordia elaeagnoides* A. DC. (Boraginaceae).

Nancy Nuñez Sandoval¹, Antonio Mora Santacruz ² y Fernando Santacruz Ruvalcaba¹.

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara.

¹Departamento de Producción Agrícola. Km 15.5 Carretera Guadalajara-Nogales. Zapopan, Jalisco, México C.P. 45110. Tel.: (33) 3777-1150; ² Departamento de Producción Forestal. Km 15.5 Carretera

Guadalajara Nogales. Zapopan, Jalisco, México.

Correo-e: FernandoSantacruz@cucba.udg.mx

Introducción:

La ubicación geográfica de nuestro territorio le otorga una cantidad de características que le permite albergar a un sin número de especies. Su fisiografía, geología, orografía, la extensión de sus litorales entre otras características, le permite a nuestro país hospedar no solo a especies de amplia o reducida distribución, si no también convertirse en una zona rica en endemismos considerada con un 52% de especies (Rzedowski 1981).

La combinación de las características de nuestro territorio provoca una innumerable cantidad de climas y microclimas en donde se desarrollan de acuerdo a Standley citado en Rzedowski (1981) aproximadamente 20,000 especies de plantas vasculares las cuales habitan y se distribuyen dentro de los 10 diferentes tipos de vegetación de nuestro país. Entre los que se encuentra el bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, hábitat de nuestra especie de estudio, *Cordia elaeagnoides* A. DC. (Boraginaceae); un árbol de importancia maderable, cuyas características de durabilidad, resistencia, usos medicinales y ornamentales le otorga un valor comercial muy alto (Pennington y Sarukhán 1998; León 1985; Lomelí 1991). Sin embargo, debido a la demanda comercial y a la ineficiencia de los procesos de propagación sexual se ha visto en la necesidad de explotar las poblaciones naturales de *C. elaeagnoides*, sumándose así al aumento de la tasa de deforestación de nuestro país, lo que coloca a México en segundo lugar a nivel América Latina y sexto a nivel mundial, perdiendo mas de ochocientas mil hectáreas de cobertura vegetal forestal anualmente (Morán 2002).

La propagación vía asexual se ha convertido en una alternativa excelente para muchas especies tanto de importancia comestible, ornamental, maderable o simplemente con la finalidad de conservar el material genético de especies en peligro

de extinción. Entre estos métodos se encuentra la propagación por estacas, esquejes o acodos; los cuales han sido muy útiles para muchas especies vegetales. Sin embargo, el número de individuos generados es directamente proporcional al material vegetal requerido.

El cultivo *in vitro* ha sido de interés en los últimos años debido a que otorga ventajas sobre otros métodos convencionales, principalmente la obtención de organismos completamente sanos además de poder generar cultivos en masa a partir incluso de una sola célula.

Una de las características de los métodos de propagación asexual radica en la poca variabilidad genética que se genera en un cultivo, por lo que se vuelve mas susceptible a los factores ambientales no controlados o hacerlo mas vulnerable a plagas y enfermedades. Por la urgente necesidad de reforestar nuestros bosques, el uso de técnicas de silvicultura monoclonal permitiría sobrellevar estos problemas por medio de un manejo adecuado de los individuos clonados logrando así el reestablecimiento de las poblaciones naturales de *C. elaeagnoides* y por lo tanto restándole peso a la sobreexplotación de otras especies.

Objetivo general:

Diseñar un protocolo eficiente para la propagación asexual de *Cordia elaeagnoides* A.DC. (Boraginaceae)

Material y métodos:

1.- Rescate de embriones y propagación masiva de *Cordia elaeagnoides*:

Se utilizaron semillas (previamente secadas y almacenadas) de *Cordia elaeagnoides* A.DC. (Boraginaceae) colectadas en Tomatlán, Jalisco.

Para llevar a cabo la técnica de rescate de embriones, las semillas fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por un periodo de 10 minutos. Se enjuagaron con agua estéril y se dejaron en remojo por 24 horas. Para la extracción del embrión fue necesaria la ayuda de un estereoscopio, se eliminó la cubierta seminal y se extrajo el embrión el cual fue sembrado en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) adicionado con 2 mg/L de Benciladenina (BA), gelificado con 8 g/L de agar, se incubaron a 25 ± 2 °C con una intensidad lumínica de 1500 luxes y un fotoperíodo de 16 horas luz/8 oscuridad, se mantuvieron por un periodo de 8 semanas, durante las cuales se realizaron varias transferencias a medios frescos

para evitar el agotamiento de los nutrientes y la acumulación de gases.

2.- Proliferación de yemas axilares en brotes de *Cordia elaeagnoides in vitro*.

Una vez obtenidos los brotes requeridos, se desarrolló el experimento multifactorial de 3x3x2 para inducir la proliferación de yemas axilares con las citocininas: 2-isopentiladenina (2ip), Benciladenina (BA) y Cinetina (Kin); cada una con 3 niveles (1, 2 y 3 mg/L), además de probar con 2 diferentes medios basales MS y McCown's (McCown y Lloyd 1981). Cada tratamiento contó con 5 repeticiones, tomando como unidad experimental un frasco de vidrio con 25 ml del medio de cultivo correspondiente, con un brote establecido con 2 a 3 nudos. Fueron incubados a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con una intensidad lumínica de 1500 luxes y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, realizando evaluaciones quincenales por un periodo de 45 días.

3. Control de oxidación de *in vitro* de explantes de *Cordia elaeagnoides* A.DC. (Boraginaceae).

Se realizó un experimento en el que se probaron productos como el nitrato de plata (1 mg/L), carbón activado (3 g/L) y una solución estéril de ácido cítrico y ácido ascórbico (200 mg/L) para la inmersión de los tejidos. En la búsqueda de eliminar la oxidación se utilizaron un total de 8 tratamientos (Cuadro 1), establecidos en medio MS a la mitad de su potencial iónico, cada uno contaba con 5 repeticiones, tomando como unidad experimental un frasco adicionado con 25 ml de medio y un brote entre 1 y 3 nudos. Fueron incubados bajo las mismas condiciones por un periodo de 45 días, realizando evaluaciones quincenales.

Cuadro 1. Lista de tratamientos establecidos para el experimento de control de oxidación en explantes de *Cordia elaeagnoides* A.DC. (Boraginaceae).

Tratamiento	Nitrato de plata	Carbón activado	Ac. Cítrico/ascórbico
1	1 mg/L	3 g/L	200 mg/L / 200 mg/L
2	1 mg/L	3 g/L	0
3	1 mg/L	0	200 mg/L / 200 mg/L
4	1 mg/L	0	0
5	0	3 g/L	200 mg/L / 200 mg/L
6	0	3 g/L	0
7	0	0	200 mg/L / 200 mg/L
8	0	0	0

Resultados y discusión.

1.- Rescate de embriones y propagación masiva de *Cordia elaeagnoides*

A. DC. (Boraginaceae):

Los resultados obtenidos con esta técnica fueron satisfactorios, del total de los embriones rescatados se obtuvo un 82% de germinación. A los 2 días posteriores al establecimiento, se inicio el proceso de germinación con el despliegue de los cotiledones. Siete días después de iniciado el cultivo el desarrollo de la planta era óptimo incluso llegaban a presentar indicios radiculares. A los 30 días los problemas oxidativos comenzaron a presentarse en la mayoría de las plantas desarrolladas.

Regla (2007) llevó a cabo investigaciones para la germinación de *C. elaeagnoides in vitro*, colocando las semilla tratadas con ácido giberélico y bajo diferentes tratamientos de desinfección por calor sobre medio MS, reportando una tasa nula de germinación, además de tener un alto porcentaje de problemas de contaminación y oxidación del medio de cultivo.

2. Proliferación de yemas axilares en brotes de *Cordia elaeagnoides* A.DC. (Boraginaceae).

Después de transcurridos 45 días del establecimiento, se encontró que no se presentaba significancia para el tipo de medio, ni para la concentración del regulador, no siendo así para el tipo de regulador utilizado, donde se reportó una alta significancia ($p=0.0004$), lo que coincide con George (1993) donde explica que la adición de citocininas tiene un efecto represor de la dominancia apical, provocando la proliferación de brotes por medio de la estimulación de las yemas axilares.

Al realizar la comparación múltiple de medias mediante la prueba LSD se encontró que la mayor estimulación de brotes después de los 45 días la ejercían los tratamientos en presencia del regulador de crecimiento Cinetina (Kin) y Benciladenina (BA), presentando una mayor eficiencia de hasta 1,5 veces mayor que en 2-isopentiladenina (2ip). En cuanto a la concentración se obtuvo en la prueba múltiple de medias que las concentraciones 1 y 2 mg/L eran más eficientes para la estimulación de brotes que aquellas que contenían 3 mg/L (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación múltiple de medias para el número de brotes de *Cordia elaeagnoides* A.DC. (Boraginaceae) estimuladas en diferentes reguladores de crecimiento a los 45 días. Prueba LSD (Diferencias Mínimas Significativas).

Regulador	Observaciones	Brotos promedio	Grupos homogéneos
2ip	30	1.53	a
Kin	30	3.033	b
BA	30	3.033	b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes $\alpha=0.05$

La presencia de tejidos oxidados fue muy notoria conforme el trascurso del tiempo, sobre todo en aquellas que se encontraban en presencia de regulador 2-isopentiladenina (2ip) y en la mayor concentración 3 mg/L, además de generar callo pubescente en la parte basal.

La importancia de la adición de reguladores de crecimiento para la inducción de brotes en *Cordia elaeagnoides* fue estrictamente necesario, por el contrario en un trabajo reportado por Tocaronte y col. (2004) se realizó la propagación de *Swietenia macrophylla* por medio de yemas axilares obteniendo que su mejor tratamiento era aquel que no contenía reguladores de crecimiento.

Aunque estadísticamente no se presentó significancia con respecto a los medios basales, originalmente el medio de cultivo MS comenzó a generar un mayor número de brotes, pero en los análisis posteriores, estos brotes fueron a la baja por el aumento en la oxidación, además de presentar un ligero amarillamiento. El medio basal McCown's presenta ligeramente una menor cantidad de brotes, pero la oxidación presentada es menor y presentan una coloración muy favorable. Esta oxidación puede deberse principalmente por la acumulación de fenoles o etileno (George 1993).

Schuler y col. (2005) demostraron que *C. alliodora* presentaba también una tasa de pérdida muy alta en el cultivo de tejidos vegetales catalogándola como una especie recalcitrante.

2. Control de oxidación en explantes de *C. alaeagnoides*.

De acuerdo a los análisis previos en los tratamientos establecidos para este experimento, se han estado observando cualitativamente resultados positivos, a pesar de que estadísticamente aun no se muestra una significancia. De acuerdo con los análisis estadísticos realizados en las primeras etapas del cultivo, se muestra solo

significancia estadística para aquellos que están en presencia de nitrato de plata y se ubica como el mejor tratamiento aquel que contenía nitrato de plata, carbón activado y en donde los tejidos fueron inmersos en ácido cítrico y ascórbico.

Conclusiones:

La técnica de rescate de embriones resulta ser eficiente para la propagación masiva de *Cordia elaeagnoides* A.DC. (Boraginaceae).

Los reguladores Kinetina (Kin) y Benciladenina (BA) obtuvieron mejores resultados para la estimulación de brotes de *Cordia elaeagnoides* y son más eficientes en concentraciones de 1 y 2 mg/L.

El tipo de medio basal utilizado no presentó significancia alguna, sin embargo, presenta una estrecha relación con el tipo de regulador que se utilice siendo ligeramente más eficiente la utilización de BA para el medio MS y Kin para el medio de McCown's.

La utilización de antioxidantes es de vital importancia para el cultivo *in vitro* de *C. elaeagnoides*.

Literatura Citada:

- George, E. F.** 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 2, In practice. Exegetics Limited. Gran Bretaña. 647-659 pp.
- León, G.** 1985. Patrones de variación de las características anatómicas de la madera en *Cordia elaeagnoides* A. DC. Tesis Licenciatura. UNAM. México. 113 p.
- Lomelí, R. M. G.** 1991. Determinación de la durabilidad de las maderas de árboles tropicales (*Hura polyandra* Baill., *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb y *Cordia elaeagnoides* A. DC.) al ataque de los hongos xilófagos, *Gutinus lepeideus* Fr. y *Laetiporus sulphureus* (Bull. Ex Fr.). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Guadalajara. 56 p.
- McCown, B.H. & G. Lloyd.** 1981. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel (*Kalmia latifolia*) by shoot tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30: 421-427.
- Morán, J.** 2002. Causas económicas e incidencia del comercio internacional en la deforestación en México. Centro Mexicano de Derecho Ambiental, A. C. México. 25-48.
- Murashige, T. & F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and

- bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Pennington, T. & D. Sarukhán.** 1998. Árboles tropicales de México, Manual para la identificación de las principales especies. UNAM, Fondo de Cultura Económica. México. 521 p.
- Regla, M. C.** 2007. Avances en la micropropagación de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Bignoniaceae) y *Cordia elaeagnoides* A. DC. (Boraginaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. México. 39 p.
- Rzedowski, J.** 1981. Vegetación de México, Limusa. México, D.F. 169-350.
- Schuler I., S. Baquero, D. Gaona, E. Vega, J. Ramírez, V. Nieto & E. Hodson.** 2005. Propagación *in vitro* del material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav) Oken (Nogal cafetero). *Revista Colombiana de Biotecnología* 7(1): 39-50.
- Tocoronte, M., M. Vielma, A. Mora & C. Valecillos.** 2004. Propagación *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de yemas axilares. *Acta Científica Venezolana*, 55: 7-12.

