

## PROTOCOLOS DE DESINFECCIÓN DE EXPLANTES DURANTE LA MICROPROPAGACIÓN DE *Cedrela odorata* L.

### EXPLANTATION DISINFECTION PROTOCOLS DURING THE MICROPROPAGATION OF *Cedrela odorata* L.

AUTORES: Alfredo Jiménez González<sup>1</sup>  
Bertha Azucena Zhindón Ganchozo<sup>2</sup>  
Blanca Soledad Indacochea Ganchozo<sup>3</sup>  
Marcos Pedro Ramos Rodríguez<sup>4</sup>

DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA: Universidad Estatal del Sur de Manabí, Km 1 ½ vía Noboa S/N Campus Los Ángeles - Jipijapa- Ecuador, [alfredo.jimenez@unesum.edu.ec](mailto:alfredo.jimenez@unesum.edu.ec)

Fecha de recepción: 10-6-2017

Fecha de aceptación: 17-07-2017

#### RESUMEN

La contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación de las especies vegetales, tanto en la investigación como en la micropropagación comercial. Tal contaminación puede ser producida por microorganismos endofíticos o microorganismos introducidos durante la manipulación de laboratorio. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar tres protocolos de desinfección de explantes para la micropropagación de *Cedrela odorata* L., en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Estatal del Sur de Manabí. La metodología aplicada se basó en el montaje de un diseño experimental en bloque completamente al azar. Se evaluaron tres tratamientos para la desinfección de explantes, obteniéndose con éxito el 95.64% de explantes establecidos en el segundo tratamiento, en el que se utilizó un protocolo de desinfección basado en Etanol al 50% (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O), Hipoclorito de Sodio (NaClO) en el 25% de su concentración. Tiempo de inmersión de 60 segundos. Existen diferencias estadísticas altamente significativas en los protocolos utilizados para la desinfección de explantes de *Cedrela odorata*. Sólo un tratamiento, T2, fue el que presentó la mayor eficiencia durante el experimento.

PALABRAS CLAVE: Propagación, especies amenazadas, madera tropical.

---

<sup>1</sup> Doctor en Ciencias Forestales. Investigador Agregado de la República del Ecuador. Docente Titular Principal de la Carrera de Ingeniería forestal, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador.

<sup>2</sup> Ingeniera Forestal y Especialista del Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador. E-mail: [azhindn@yahoo.com](mailto:azhindn@yahoo.com)

<sup>3</sup> Doctora en Ciencias Forestales. Docente Titular Principal de la Carrera de Ingeniería agropecuaria Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador. E-mail: [blanca.indacochea@unesum.edu.ec](mailto:blanca.indacochea@unesum.edu.ec)

<sup>4</sup> Doctor en Ciencias Forestales. Investigador Agregado de la República del Ecuador. Docente Titular Principal de la Carrera de Ingeniería forestal, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador. E-mail: [marcos.ramos@unesum.edu.ec](mailto:marcos.ramos@unesum.edu.ec)

## ABSTRACT

Microbial contamination is one of the most serious problems in micropropagation of plant species, both in research and in commercial micropropagation. Such contamination may be produced by endophytic microorganisms or microorganisms introduced during laboratory manipulation. The present work was carried out with the objective of to evaluate a disinfection protocol of explants for the micropropagation of *Cedrela odorata* L., in the plant biotechnology laboratory of the Southern State University of Manabí. The applied methodology was based on the assembly of an experimental design in block completely at random. Three treatments were evaluated for the disinfection of explants, successfully obtaining 95.64% of explants established in the second treatment, in which a disinfection protocol based on 50% Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O), Sodium Hypochlorite (NaClO) in 25% of its concentration, with a time of immersion of 60 seconds. There are statistically significant differences in the protocols used for the disinfection of *Cedrela odorata* explants. Only one treatment, T2, was the one that presented the highest efficiency during the experiment.

**KEYWORDS:** propagation, threatened species, tropical timber.

## INTRODUCCIÓN

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) enumeró a *C. odorata* como una especie que se enfrenta a un alto riesgo de extinción en el medio silvestre a medio plazo (IUCN, 2004). Para fines de reforestación, el Ministerio del Medio Ambiente (MAE) ratifica a *C. odorata* como una de las especies nativas más utilizadas (Grijalva *et al.*, 2012). La *Cedrela* figura en el Apéndice III de la lista de especies prioritarias de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2016).

Existen pocas alternativas que permitan recuperar a corto plazo la riqueza genética de *C. odorata*, mencionada entre las especies que se encuentran en alto riesgo de extinción, razón suficiente que motiva la multiplicación por medio de la micropropagación. En las dos últimas décadas las técnicas biotecnológicas han contribuido a la generación de una metodología de cultivo *in vitro*, así como a los avances en los estudios de propagación de *C. odorata* a través de embriogénesis somática (García *et al.*, 2011; Cameron, 2010). Los principales problemas que presenta la propagación *in vitro* del cedro son: contaminación de brotes apicales y segmentos nodales, hiperhidricidad, escasa disponibilidad de explantes, sensibilidad a la desinfección y lenta germinación.

En este sentido, el objetivo general del trabajo consiste en evaluar el uso de protocolos de desinfección de explantes en la micropropagación de *C. odorata* en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad del Sur de Manabí.

## DESARROLLO

Materiales y métodos

Manabí, ubicada en el km 1 1/2 de la carretera Jipijapa - Noboa entre las coordenadas 17 M 0548196 y UTM 9850644.

Factores en estudio

Factor A: Explantes de *C. odorata*

Factor B: Concentración de los reactivos utilizados en el tratamiento.

Tipo del diseño: Bloque completamente al azar.

Tratamientos: 4

Repeticiones: 3

Los procedimientos utilizados en la fase de establecimiento se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Tratamientos utilizados en la etapa de establecimiento de *C. odorata*.

Tt	HgCl <sub>2</sub> Tween	T (s)	P	T (s)	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	T (s)	NaClO	T (s)
TT	0%	-	0%	-	0%	-	0%	-
T1	0.50%	180	5%	300	75%	180	50%	180
T2	0.50%	180	5%	300	50%	60	25%	60
T3	0.50%	180	5%	300	25%	300	75%	300

Tt: tratamientos; TT: Testigo; T1: Tratamiento 1; T2: tratamiento 2; T3: Tratamiento 3; HgCl<sub>2</sub>: Bicloruro de mercurio; T(s): Tiempo en segundos; P: Povidyn; NaClO: Hipoclorito de sodio.

#### *Obtención de explantes*

Los explantes utilizados en esta investigación fueron yemas axilares y capullos apicales de plantas de *C. odorata* de seis meses de edad, seleccionadas de la zona de vivero de los árboles del laboratorio, que recibieron atención cultural apropiada (Lorsban en dosis de 2 ml/l Phytan a 2,5 ml/l), el tratamiento se aplicó dos días a la semana, durante el período de 21 días antes del corte de los explantes.

#### *Recolección de explantes*

Para la recolección de explantes se utilizó: frasco con ácido ascórbico; tijeras de disección; plantas seleccionadas; frasco de acero inoxidable con alcohol; frasco de acero inoxidable con agua destilada.

Se inició el corte de las ramas de *C. odorata* eliminando sus hojas, dejando yemas axilares y yemas apicales de 3 cm de largo, segmentados en la parte superior en forma recta y el corte en bisel por la parte inferior, estos explantes fueron sumergidos en una solución de ácido ascórbico a concentración de 1g/l para evitar la oxidación fenólica.

#### *Protocolos de desinfección para explantes utilizados fuera del flujo laminar*

Para todos los explantes se utilizó un tratamiento en general, mismo que consistió en:

1. Eliminación del ácido ascórbico producto de la recolección de explantes, realizando un enjuague con agua estéril.
2. Se sumergieron los explantes en bicloruro de mercurio al 0.50 % de concentración más dos gotas de Tween 80 durante 180 s, en la zaranda orbital a 140 rpm.
3. Posteriormente se realizó tres enjuagues con agua estéril para eliminar residuos.

4. Se reservaron los explantes en agua estéril, para posteriormente realizar el respectivo proceso dentro de la cámara del flujo laminar.

#### *Protocolos de desinfección para explantes utilizados dentro del flujo laminar*

De acuerdo con los datos presentados en la tabla 3, los tratamientos se aplicaron como sigue:

1. En la cámara de flujo laminar se colocó Povidyn al 5% de su concentración durante 300 s, luego se retiró el líquido realizando seis enjuagues para descartar los desechos.
2. Se aplicó alcohol a diferentes concentraciones y tiempos según tratamientos establecidos.
3. Eliminación de residuos, realizando tres enjuagues con agua estéril, seguido de ello se utilizó el hipoclorito de sodio en concentraciones y tiempos de acuerdo con los tratamientos, realizando tres enjuagues con agua estéril para eliminar residuos.

#### *Resultados*

A diferencia del resto de los tratamientos, la aplicación del protocolo de desinfección en el tratamiento No. 2, proporcionó un equilibrio óptimo en la concentración, resultando en 95.64% de explantes establecidos. Otros trabajos publicados, a saber Jiménez *et al.* (2007), desinfectados con tres concentraciones más bajas de NaOCl 1.0; 1.5% y 2.0%, combinados con tres tiempos de exposición más elevados (300 s, 600 s y 900 s), alcanzaron un 84% de supervivencia y un 10% de contaminación de los explantes con desinfección durante 600 s por inmersión en NaClO al 1.5%.

Tabla 2. Datos del análisis de la varianza de explantes establecidos correspondiente a la evaluación realizada a los 21 días de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	223,58	3	74,53	447,17	<0,0001
TRATAMIENTO	223,58	3	74,53	447,17	<0,0001
Error	1,33	8	0,17		
Total	224,92	11			

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Establecidos	12	0,99	0,99	14,00

**Tabla 3.** Prueba de Tukey de explantes establecidos, evaluación realizada a los 21 días de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

Tratamiento	Medias	N	E.E.	
T2	10,33	3	0,24	A
T3	1,33	3	0,24	B
TT	0,00	3	0,24	C
T1	0,00	3	0,24	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**REFERENCIAS**

- Cameron, S. (2010). Plant regeneration in spanish cedar. *Cedrela odorata* L. using zygotic embryo explants from mature seed and improvement of embryogenic nodule initiation by heat shock. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant* 46(2): 126-133.
- CITES. (2016). Apéndices I, II y III Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Recuperado el 11 de 08 de 2016.
- García, R., Delgado, M., Gonzáles, Y., Gonzáles, A., Garriga, M., Caligari, P., Carrasco, B., Quiroz, K. (2011). In vitro propagation of Cedar (*Cedrela odorata* L.) from juvenile shoots. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71(3): 376-382.
- Grijalva, J., Checa, X., Ramos, R., Barrera, P. y Limongi, R. (2012). Situación de los Recursos Genéticos Forestales—Informe País Ecuador. Preparado por el Programa Nacional de Forestería del INIAP con aval del INIAP.
- Jiménez -Terry, F., Barbón, R., La O, M. Pérez, M., Collado, R., Acosta-Suárez, M., Alvarado-Capó, Y., Agramonte, D. (2007). Efecto de la revigorización en el establecimiento in vitro de ápices y segmentos nodales de *Cedrela odorata* L. *Biotecnología vegetal*. 7(1).
- UICN. (2004). Americas Regional Workshop on Conservation and Sustainable Management of Trees (*Cedrela odorata*). In IUCN Red list of threatened species. Obtenido de <http://www.resdlist.org>

