

## PROTOCOLO DE MULTIPLICACIÓN Y CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE CUATRO ESPECIES FORESTALES TROPICALES DE SEMILLAS RECALCITRANTES



**Protocolo de multiplicación y conservación *in vitro* de cuatro especies forestales tropicales de semillas recalcitrantes**

**CASO: Cedro Rojo (*Cedrela odorata*)**



**Participantes:**

**Dr. Carlos Roman Castillo Martínez**  
**Dra. Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez**  
**Dr. Carlos Hugo Avendaño Arrazate**  
**Mc. Bartolo Rodríguez Santiago**

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
OBJETIVOS .....	6
General.....	6
Específicos .....	6
METODOLOGÍA.....	7
Recolección de material inicial para propagación .....	7
Establecimiento del material inicial.....	7
Multiplicación <i>in vitro</i> .....	8
Ensayos de crecimiento mínimo .....	8
RESULTADOS .....	9
Establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> para cedro rojo ( <i>Cedrela odorata</i> ).....	11
Tren de desinfección para semilla de cedro rojo. ....	11
Tren de desinfección para meristemos de cedro rojo.....	11
Multiplicación.....	13
Crecimiento mínimo para cedro rojo ( <i>Cedrela odorata</i> ).....	15
CONCLUSIONES.....	16
BIBLIOGRAFÍA .....	17
ANEXO .....	18

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Número de accesiones recolectadas de cedro rojo y establecidas en condiciones <i>in vitro</i> .....	<b>9</b>
<b>Cuadro 2.</b>	Medio de cultivo para desarrollo y multiplicación de cedro rojo <i>in vitro</i> evaluado a 30 días de su cultivo.....	<b>13</b>
<b>Cuadro 3</b>	Respuesta a formación de brotes de cedro rojo con dos reguladores de crecimiento y diferentes concentraciones.....	<b>13</b>
<b>Cuadro 4.</b>	Medio de cultivo y combinación de reguladores de crecimiento para desarrollo y multiplicación de cedro rojo <i>in vitro</i> .....	<b>13</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	A) Selección de áreas, B) individuos para recolectar material vegetativo y seminal.....	<b>10</b>
<b>Figura 2.</b>	A) Selección y disección de varetas de los árboles seleccionados, B) Empacado en toallas de papel interdoblas absorbentes.....	<b>10</b>
<b>Figura 3.</b>	A) Tratamiento de semilla en hipoclorito de sodio, B) Enjuague en condiciones asépticas en campana de flujo laminar posterior a los tiempos desinfección.....	<b>12</b>
<b>Figura 4.</b>	A) Disección de segmentos nodales con meristemos axilares de cedro rojo, B) Siembra de explantes en medio de cultivo.....	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b>	A) Establecimiento <i>in vitro</i> de cedro rojo a partir de meristemos axilares, B) formación de brotes <i>in vitro</i> en el medio con mejor respuesta.....	<b>14</b>
<b>Figura 6.</b>	Formación de brotes <i>in vitro</i> de cedro rojo en el medio con mejor respuesta a 60 días.....	<b>14</b>
<b>Figura 7.</b>	Respuesta de crecimiento en longitud y número de brotes a diferentes temperaturas de conservación para <i>Cedrela odorata</i> a los	

	60 días.....	14
<b>Figura 8.</b>	Respuesta en el crecimiento de cedro rojo a 16 °C a los 60 días del establecimiento, el mejor tratamiento a la izquierda y el testigo a la derecha.....	15

## RESUMEN

Con objeto de generar tecnología que permita conservar a largo plazo germoplasma de especies forestales tropicales con semillas recalcitrantes como cedro rojo (*Cedrela odorata*) a través de técnicas de cultivo de tejidos, se evaluaron las condiciones para el establecimiento, multiplicación y crecimiento mínimo. Para ello se probaron diferentes tipos de tejido (seminal y vegetativo) para ser usados como explantes iniciales, de igual manera fueron probados tres medios de cultivo y diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento para favorecer la formación de nuevos brotes. Finalmente se evaluaron factores limitantes del crecimiento *in vitro* (temperatura y carbohidratos del medio de cultivo). Durante el presente estudio fue posible establecer esta especie en condiciones *in vitro* y factible su micropropagación además de tener a la fecha la evaluación de dos ensayos de crecimiento mínimo con una respuesta de reducción de crecimiento en condiciones *in vitro* significativa. Estos resultados promisorios pueden ser el inicio para generar Bancos de Germoplasma *in vitro* de esta especie a corto plazo permitiendo el resguardo de material genético del país.

## INTRODUCCIÓN

Especies como *Cedrela odorata*, que es nativa, maderable y apreciada por la calidad de la madera que se obtiene de ella; no es posible la conservación de sus semillas a largo plazo debido a que las especies forestales tropicales de explotación maderable en su mayoría poseen semillas recalcitrantes, motivo que impide su conservación en Bancos de Germoplasma convencionales (cámaras frías), ya a que al bajar la temperatura y contenido de humedad de las semillas se disminuye drásticamente la viabilidad y poder germinativo de las mismas, reduciendo el tiempo de conservación bajo estas condiciones a pocos meses. Razón por lo cual la conservación *in vitro* es una alternativa que permite conservar las características genéticas de los individuos y que a través de condiciones limitantes (crecimiento mínimo) pueden conservar a mediano y largo plazo las accesiones de éste tipo de especies, motivos por lo que se sugiere generar Bancos de Germoplasma *in vitro*, ya que los tejidos en condiciones *in vitro* se pueden preservar de manera indefinida conservando sus características genéticas. Siendo los primeros pasos el desarrollo de protocolos de establecimiento y multiplicación *in vitro* y las condiciones óptimas para el crecimiento mínimo de plantas micropropagadas.

## OBJETIVOS

### General

- Generar un técnica de conservación a mediano plazo para especies forestales maderables con semillas recalcitrantes como cedro rojo (*Cedrela odorata*), mediante protocolos de conservación *in vitro*, generando un modelo para el establecimiento de bancos de germoplasma *in vitro* de ésta especie.

### Específicos

- Generar protocolos para establecimiento *in vitro* de *Cedrela odorata*
- Generar protocolos de crecimiento mínimo para *Cedrela odorata*
- Contar con germoplasma de ésta especie para su conservación *ex situ* a mediano y largo plazo.

## **METODOLOGÍA**

### **Recolección de material inicial para propagación**

La recolección inicial del material se realizó en rodales naturales forestales en los estados de Chiapas y Quintana Roo, donde se localizaron individuos de cedro rojo *Cedrela odorata*. Se localizaron rodales, dentro de cada una de las localidades que fueron elegidas en los estados mencionados, se realizó una selección de fenotipos que consistió en identificar los mejores individuos con las características fenotípicas y sanidad óptimas (fuste recto, sin presencia de daños por enfermedad o plaga), de acuerdo al objetivo que se tiene para ésta especie, dentro los rodales naturales donde se distribuyen ecológicamente los individuos de la especie.

### **Establecimiento del material inicial**

Una vez que llegó el material vegetativo o seminal al laboratorio se revisó el estado en que llegó, en búsqueda de posibles contaminantes como hongos o bacterias, que pudieran estar presentes, posterior a la inspección visual y con base en los trabajos previamente realizados por Anwar *et. al.* (1985), se probaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio al 1.25 y 2.5 % adicionado con agente surfactante, se probaron cuatro tiempos de desinfección 5, 10, 15 y 20 minutos, para el establecimiento inicial a partir de yemas axilares, estableciendo 4 repeticiones por cada tratamiento. A su vez se establecieron yemas adventicias extraídas de las varetas recolectadas, se les dio un lavado con jabón comercial y agua corriente, para eliminar polvo y partículas adheridas a los tejidos, posteriormente se colocaron en los tratamientos. Al término de cada uno de ellos, se realizaron tres enjuagues con agua destilada y esterilizada, bajo condiciones asépticas, en campana de flujo laminar, retirando el exceso de agua en toallas de papel esterilizadas y se sembraron en el medio correspondiente. El material establecido se usó para los ensayos de multiplicación por organogénesis directa.

## **Multiplicación *in vitro***

Para la multiplicación *in vitro* se investigó la respuesta a la organogénesis directa a partir de meristemos en tres diferentes medios de cultivo MS, WPM y SH (ver anexo), con las combinaciones de reguladores de crecimiento siguientes: para formación de brotes adventicios BA, Kin y de raíces fue con ANA, AIA y AIB (ver anexo). Se establecieron bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial, donde a = es la especie cedro rojo y b = es el regulador de crecimiento (BA, Kin), con cuatro repeticiones y tratadas con los diferentes reguladores, se sembraron en tubos de ensaye de acuerdo al diseño antes mencionado para el medio MS, repitiendo el mismo diseño con el medio WPM y SH. Se analizaron las respuestas en SAS mediante comparación de medias con un alfa de 0.05.

El presente estudio se realizó bajo el diseño siguiente:

$$1. \quad X_{ijk} = m + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

$X_{ijk}$  = observación cualquiera.

$m$  = efecto real de la media.

$A_i$  = efecto del nivel  $i$  ésima especie.

$B_j$  = efecto del nivel  $j$  ésimo regulador de crecimiento.

$(AB)_{ij}$  = efecto de la interacción del nivel  $i$  ésima especie con el nivel  $j$  ésimo regulador de crecimiento

$E_{ijk}$  = efecto aleatorio

## **Ensayos de crecimiento mínimo**

Se probaron tres temperaturas de conservación 24 °C (testigo), 18 °C y 16 °C además de modificar los medios de crecimiento adicionando manitol al 2.5, 5, 10, 15 y 20 g L<sup>-1</sup> y se realizaron evaluaciones del crecimiento cada 30 días para comparar el efecto de estos factores en el crecimiento (longitud de brotes en milímetros) de las accesiones previamente establecidas y multiplicadas *in vitro*.



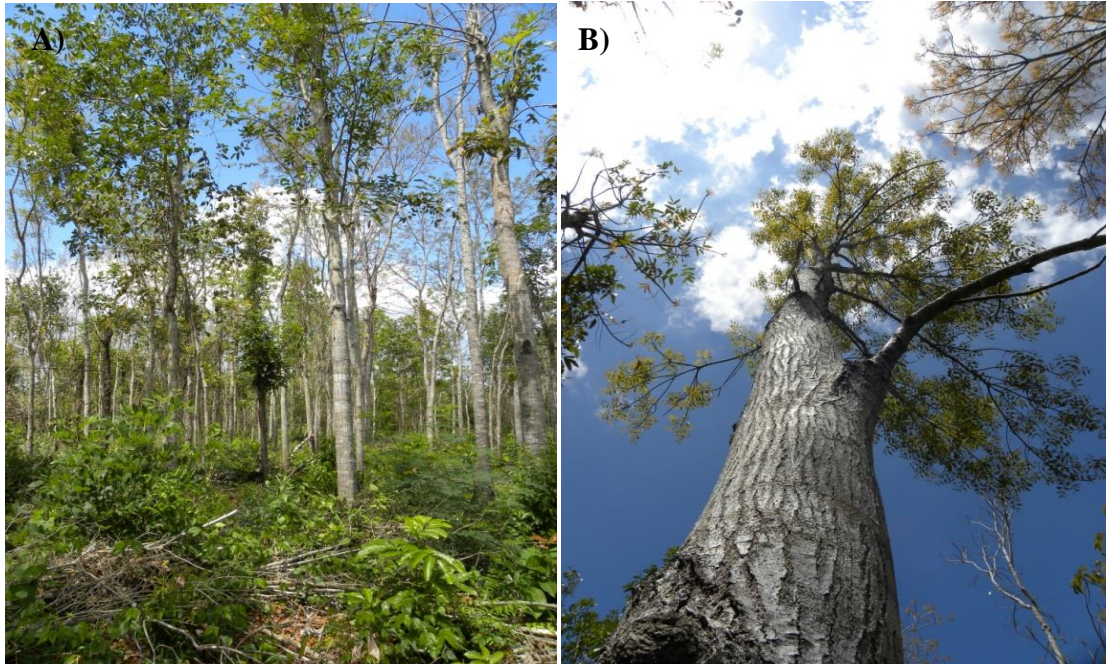
## RESULTADOS

Se recolectó muestras de material tanto vegetativo como seminal de cedro rojo de los estados de Quintana Roo y Chiapas. Para el caso de meristemas se seccionaron ramas como vareta con un promedio de 25 cm de longitud y 6 a 8 meristemas por vareta, recolectando al menos 10 varetas por árbol. Con respecto a la recolecta de semilla se cosechó en promedio 250 gramos por árbol (por ser una semilla pequeña) de *Cedrela odorata* y se transportaron en hieleras selladas.

Es importante tomar en cuenta la ontogenia de las partes vegetativas del árbol y usar varetas del primer tercio del individuo seleccionado.

**Cuadro 1.** Número de accesiones recolectadas de cedro rojo y establecidas en condiciones *in vitro*

Nombre común/accesión	Especie	Localidad	<i>in vitro</i>
Cedro1	<i>Cedrela odorata</i>	Mpio. Bacalar P. Q. Roo	Establecida
Cedro2	<i>Cedrela odorata</i>	Mpio. Felipe Carrillo P. Q. Roo	Establecida
Cedro3	<i>Cedrela odorata</i>	Mpio. Othón P. Blanco, Q. Roo	Establecida
Cedro4	<i>Cedrela odorata</i>	Mpio. Tapachula Chiapas	Establecida
Cedro5	<i>Cedrela odorata</i>	Mpio. Cacahutan Chiapas	Establecida
Cedro6	<i>Cedrela odorata</i>	Mpio. Cacahutan Chiapas	Establecida
Cedro7	<i>Cedrela odorata</i>	Mpio. Othón P. Blanco, Q. Roo	Establecida
Cedro8	<i>Cedrela odorata</i>	Mpio. Felipe Carrillo P. Q. Roo	Establecida
Cedro9	<i>Cedrela odorata</i>	Mpio. Felipe Carrillo P. Q. Roo	Establecida
Cedro10	<i>Cedrela odorata</i>	Mpio. Othón P. Blanco, Q. Roo	Establecida



**Figura 1.** A) Selección de áreas, B) Individuos para recolectar material vegetativo y seminal.



**Figura 2.** A) Selección y disección de varetas de los árboles seleccionados, B) Empacado en toallas de papel interdobladas absorbentes.

### **Establecimiento y multiplicación *in vitro* para cedro rojo (*Cedrela odorata*)**

Bajo estos sistemas se logró el establecimiento de los materiales con una sobrevivencia de más del 80 % tanto para material vegetativo como seminal. Cuando se usaron semillas como material inicial, cada lote pasó por el análisis de calidad de semilla observándolas en la cámara de rayos X y se realizó prueba de germinación en cajas especiales (cajas rectangulares de plástico con tapa de cierre por fricción, con medidas de largo 6 <sup>3</sup>/<sub>4</sub>"", ancho 4 <sup>3</sup>/<sub>4</sub>" y alto 2-3 <sup>3</sup>/<sub>8</sub>" de la marca SEEDBURO), conforme a las reglas de la ISTA. Dentro de la caja se colocaron sanitas húmedas y sobre las sanitas papel filtro húmedo, las cajas se colocaron dentro de una cámara de crecimiento con 16 h de luz a una temperatura de 24° C. A través de esta prueba se observó el estado físico de la semilla y el porcentaje de germinación. Derivado de los cuestionamientos en diferentes foros sobre la reducción de la diversidad genética al usar material únicamente vegetativo y con los fines de garantizar variabilidad en las accesiones resguardadas se usaron, además de partes vegetativas, semillas como accesiones de colección núcleo (semilla proveniente de árboles representativos del rodal).

#### **Tren de desinfección para semilla de cedro rojo.**

24 hrs de imbibición en agua bidestilada.

30 minutos en jabón Roma® 5 g/L.

2 horas en Captan® 3g/L.

2 minutos en Etanol 70%.

30 minutos en hipoclorito 30% (6% de cloro activo).

3 enjuagues en campana de flujo laminar con agua bidestilada estéril.

60 minutos en antioxidantes ácido cítrico 2.5 mg/L y ácido ascórbico 2.5 mg/L.

#### **Tren de desinfección para meristemos de cedro rojo.**

30 minutos en jabón Roma® 5 g/L.

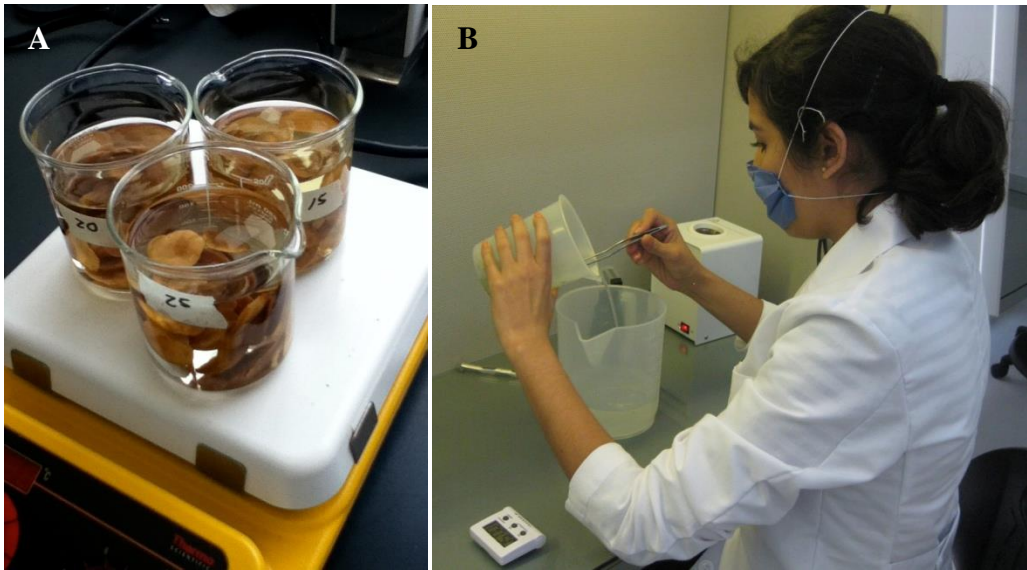
1 enjuague con agua bidestilada

60 minutos en Captan® 3g/L

2 minutos en Etanol 70%

8 minutos en Hipoclorito 30% (6% de cloro activo)

3 enjuagues en campana de flujo laminar con agua bidestilada estéril  
20 minutos en antioxidantes ácido cítrico 2.5 mg/L y ácido ascórbico 2.5 mg/L



**Figura 3.** A) Tratamiento de semilla en hipoclorito de sodio, B) Enjuague en condiciones asépticas en campana de flujo laminar posterior a los tiempos desinfección.

## Multiplicación

De los diferentes medios probados para *Cedrela odorata* a la fecha se han observado respuestas positivas en cuanto a la formación de nuevos brotes *in vitro*.

La información de los mejores medios y combinación de reguladores de crecimiento se observa en los cuadros 2, 3 y 4.

**Cuadro 2.** Medio de cultivo para desarrollo y multiplicación de cedro rojo *in vitro* evaluado a 30 días de su cultivo.

Tratamiento (Medio de cultivo)	Tasa de multiplicación (número de brotes por explante)	Crecimiento (Longitud en mm)
MS	2.9 a	69 a
WPM	1.6 b	41 c
SH	1.2 b	55 b

Letras diferentes son desiguales para cada columna difieren para  $p < 0.05$  según prueba de Tukey.

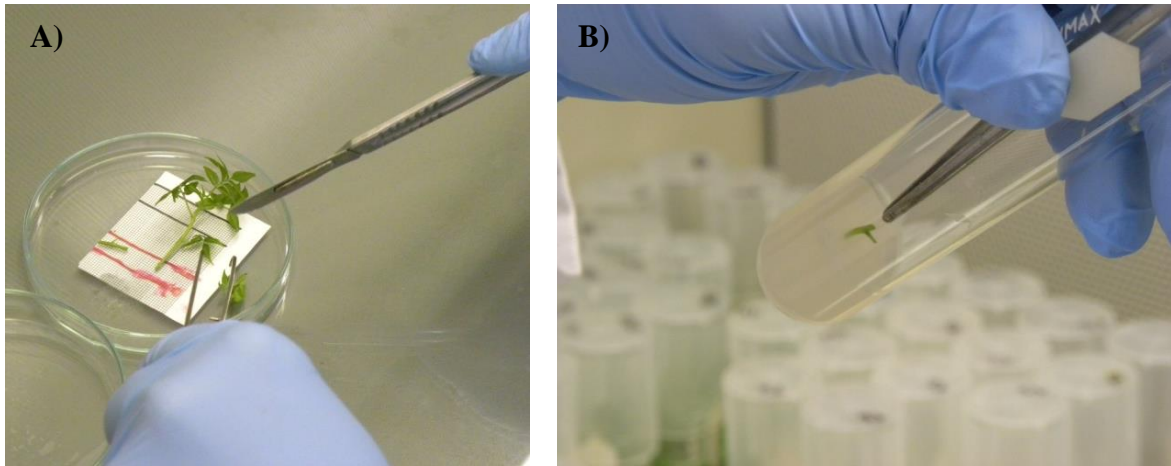
**Cuadro 3.** Respuesta a formación de brotes de cedro rojo con dos reguladores de crecimiento y diferentes concentraciones.

Regulador BA/ANA mgL <sup>-1</sup>	0	0.05	0.08	0.1	0.15	0.2
0	0	0	0	0	0 C	0 C
0.5	0	0	0	0 R	0 C	0 C
0.8	0	1.32	1.78	1.22 C	0 C R	0 C
1.0	1.35	2.92	2.28	1.17	1.09 CR	0 C
1.5	1.22	1.26	1.05	0 C	0 CR	0 C
2.0	0 C	1.26 C	0 C	0 C	0 CR	0 C

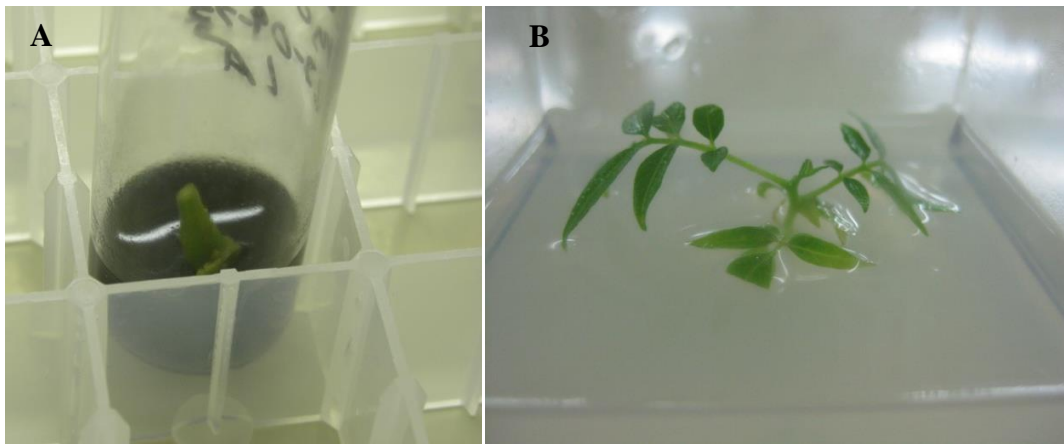
La letra C indica que se observó formación de callo en el tratamiento y la R que hubo presencia de raíces incipientes.

**Cuadro 4.** Medio de cultivo y combinación de reguladores de crecimiento para desarrollo y multiplicación de cedro rojo *in vitro*.

Especie	Medio de cultivo/Reguladores de crecimiento
Cedro Rojo	MS 100% + vitaminas, sacarosa 3%, BA 1.0 mg/l más ANA 0.05 mg/l, carbón activado 3 g/l, pH 5.7 y Agar 9 g/l.



**Figura 4.** A) Disección de segmentos nodales con meristemos axilares de cedro rojo, B) Siembra de explantes en medio de cultivo.



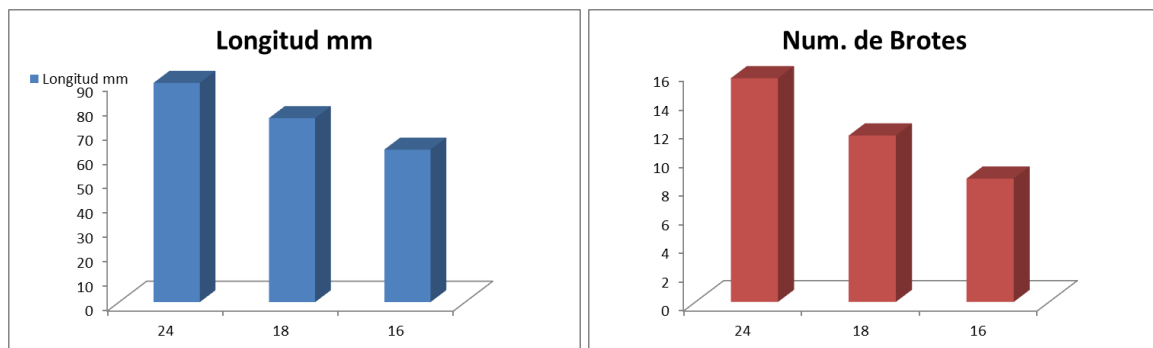
**Figura 5.** A) Establecimiento *in vitro* de cedro rojo a partir de meristemos axilares, B) Formación de brotes *in vitro* en el medio con mejor respuesta.



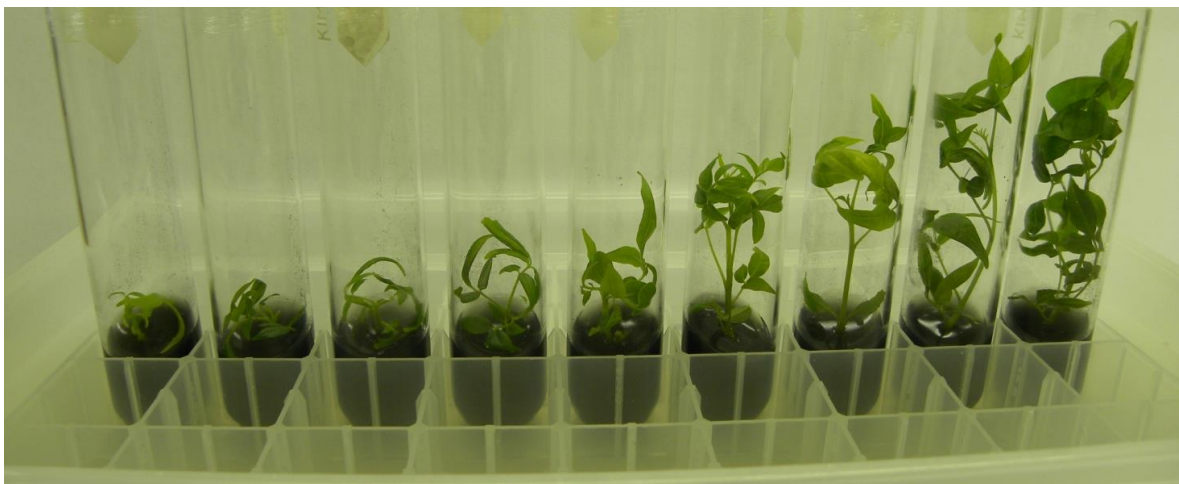
**Figura 6.** Formación de brotes *in vitro* de cedro rojo en el medio con mejor respuesta a 60 días.

### **Crecimiento mínimo para cedro rojo (*Cedrela odorata*)**

A la fecha se han logrado realizar dos evaluaciones a los a 30 y 60 días en condiciones de crecimiento mínimo para *Cedrela odorata*, con una respuesta favorable, misma que permite de manera preliminar suponer que será factible conservar bajo estas condiciones esta especie a mediano plazo. Los resultados se observan en la figura 7.



**Figura 7.** Respuesta de crecimiento en longitud y número de brotes a diferentes temperaturas de conservación para *Cedrela odorata* a los 60 días.



**Figura 8.** Respuesta en el crecimiento de cedro rojo a 16 °C a los 60 días del establecimiento, el mejor tratamiento a la izquierda y el testigo a la derecha.

## CONCLUSIONES

- Se estableció *in vitro* *Cedrela odorata* a través de yemas vegetativas como de tejido seminal en medio MS al 100% más vitaminas, sacarosa al 3%, BA 1.0 mg/l más ANA 0.05 mg/l, carbón activado 3 g/l, pH 5.7 y Agar 9 g/l.
- Se tienen accesiones de *Cedrela odorata* en condiciones de crecimiento mínimo y se encuentran en evaluación continua.
- A los 60 días de evaluación se encontró que a temperatura de 16 °C se observó reducción significativa en la tasa de crecimiento.



## BIBLIOGRAFÍA

- Campell, R. and D. Durzan. 1975. Induction of multiple buds and needles on tissue cultures of *Picea glauca*. Canadian Journal of Botany. 53: 1652-1657.
- Day J. and G. Stacey. 2007. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Second Edition. Human Press. 348 pp.
- Joshi, I., P. Bisht., V. K. Sharma, and D.P. Uniyal. 2003. *In vitro* propagation of mature F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* SM. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). Silvae Genetica 52:3-4, 110-113.
- Murashige, I. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473- 497
- Park Y., J. Barret and J. Boga. 1998. Application of somatic embryogenesis in high value forestry: Development genetic control and statability of cryopreserved clones. *In vitro* Cell. Biol. 34:231-339.
- Rao P. S. and V. A. Bapat. 1993. Micropropagation of sandalwood (*Santlum album* L.) and mulberry (*Morus indica* L.). In: M. R. Ahuja (ed.). Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 317-345.
- Suhartono L., F. Van Iren, W. Winter and R. Verporte. 2005. Metabolic comparison of cryopreserved an normal cell from *Taberemontana divaricata* suspension cultures. Plant Tissue and Organ Culture. 83: 59–66.
- Scocchi, A. and L. Mroginski. 2004. *In vitro* conservation of apical meristem-tip of *Melia azedarach*. L. (Meliaceae) under slow-growth conditions. Phyton 137-143.
- Widiyanto, S. N., D. Erytrina and H. Rahmania. 2005. Adventitious shoot formation on teak (*Tectona grandis* L.f.) callus cultures derived from internodal segments. Acta Horticulturae 692: 153-157.

## ANEXO

Molecular formula	MW	Nombre (Español)	Nombre (Ingles)	Medio (mg/L)		
				MS	WPM	B5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80.04	Nitrato de Amonio	Ammonium Nitrate	1650	400	
KNO <sub>3</sub>	101.10	Nitrato de Potasio	Potassium Nitrate	1900		3000
KCl	74.55	Cloruro de Potasio	Pottasium Chloride			
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	174.26	Sulfato de Potasio	Pottasium Sulfate		990	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	147.01	Cloruro de Calcio	Calcium Chrolide Dihydrate	440	96	150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	132.14	Sulfato de Amonio	Ammonium Sulfate			134
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	236.15	Nitrato de Calcio	Calcium Nitrate Tetrahydrate		556	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	146.48	Sulfato de Magnesio	Magnesium sulfate Heptahydrate	370	370	250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	Fosfato Diácido de Potasio	Pottasium Dihydrogenphosphate	170	170	
NaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	156.01	Fosfato Diácido de Sodio dihidratado	Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate			169.6
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	278.02	Sulfato Ferrico heptahidratado	Iron Sulfate Heptahydrate	27.8	27.8	
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	399.88	Sulfato Ferrico	Iron (III) Sulfate			
Na <sub>2</sub> ·EDTA	372.24	Sal disódica de Ácido Etilendiaminotetraacético	Ethylendiaminetetraacetic Acid Disodium Salt, 2-Hydrate	37.3	37.3	
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	151.00	Sulfato de Magnesio	Manganese Sulfate Tetrahydrate	22.3	22.3 (H2O)	13.2 (H2O)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142.04	Sulfato de Sodio	Sodium Sulfate			
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	287.56	Sulfato de Zinc	Zinc Sulfate Heptahydrate	8.6 (4H2O)	8.6	2
FeNa-EDTA	367.05	Sal de fierro y sodio de Etilendiaminotetraacético	Ethylendiaminetetraacetic Acid Monosodium Iron (III) Salt			40
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	237.93	Cloruro de Cobalto	Cobalt (II) Chloride Hexahysrate	0.025		0.025
CuCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249.68	Cloruro de Cobre	Copper (II) Chloride Pentahydrate	0.025	0.25	0.025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249.68	Sulfato de Cobre (II) pentahidratado	Copper(II) sulfate Pentahydrate			
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	241.95	Molibdato de Sodio Dihidratado	Sodium Molybdate	0.25	0.25	0.25
KI	166.01	Yoduro de Potasio	Pottasium Iodide	0.83		0.75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.83	Ácido Bórico	Boric Acid	6.2		3
NaNO <sub>3</sub>	84.99	Nitrato de Sodio	Sodium Nitrate		6.2	
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	115.03	Fosfato Diácido de Amonio	Ammonium Dihydrogenphosphate			
C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> NCOOH	123.11	Ácido Nicotínico	Nicotinic Acid	0.5		1
C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ·HCl	205.64	Hidroclorhidrato de Piridoxina	Pyridoxine Hydrochloride	0.5	0.5	1
C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS·HCl	337.27	Hidroclorhidrato de Tiamina	Thiamine Hydrochloride	0.1	1	10
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> (OH) <sub>6</sub>	180.16	mio-Inositol	myo-Inositol	100	100	100
C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	441.40	Ácido Fólico	Folic Acid			
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	244.31	Biotina	Biotin			
[HOCH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(OH)CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO] <sub>2</sub>	476.54	Pantotenato de Calcio	Calcium (+) -Pantothenate			
H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> COOH	75.07	Glicina	Glycine	2	2	
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S·HCl·H <sub>2</sub> O	175.64	Hidroclorhidrato de Cisteina Monohidratado	Cysteine Hydrochloride Monohydrate			
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	342.30	Sacarosa	Sucrose	30000	20000	20000

**Protocolo de multiplicación y conservación *in vitro* de cuatro especies forestales tropicales de semillas recalcitrantes**

**CASO: Caoba (*Swietenia macrophylla*)**



**Participantes:**

**Dr. Carlos Roman Castillo Martínez**  
**Dra. Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez**  
**Dr. Carlos Hugo Avendaño Arrazate**  
**Mc. Bartolo Rodríguez Santiago**

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	22
INTRODUCCIÓN.....	23
OBJETIVOS .....	23
General.....	23
Específicos .....	23
METODOLOGÍA.....	24
Recolección de material inicial para propagación .....	24
Establecimiento del material inicial.....	24
Multiplicación <i>in vitro</i> .....	25
Ensayos de crecimiento mínimo .....	25
RESULTADOS .....	26
Recolección de material inicial para propagación .....	26
Establecimiento del material inicial para caoba ( <i>Swietenia macrophylla</i> ).....	27
Tren de desinfección para semilla de <i>Swietenia macrophylla</i> .....	28
Tren de desinfección para meristemos de <i>Swietenia macrophylla</i> .....	28
Multiplicación <i>in vitro</i> .....	28
Crecimiento mínimo para caoba ( <i>Swietenia macrophylla</i> ).....	31
CONCLUSIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b> 33
ANEXO.....	34

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Número de accesiones recolectadas de caoba y establecidas <i>in vitro</i> .....	<b>26</b>
<b>Cuadro 2.</b>	Medio de cultivo para desarrollo y multiplicación de caoba <i>in vitro</i> evaluado a 30 días de su cultivo.....	<b>29</b>
<b>Cuadro 3.</b>	Respuesta a formación de brotes de caoba con dos reguladores de crecimiento y diferentes concentraciones.....	<b>29</b>
<b>Cuadro 4.</b>	Medio de cultivo y combinación de reguladores de crecimiento para desarrollo y multiplicación de caoba <i>in vitro</i> .....	<b>29</b>

## INDICES DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Selección de áreas e individuos para recolectar material vegetativo y seminal.....	<b>27</b>
<b>Figura 2.</b>	A) Selección y disección de varetas de los árboles seleccionados, B) Empacado en toallas de papel interdoblas absorbentes.....	<b>27</b>
<b>Figura 3.</b>	A) Disección de segmentos nodales con meristemos axilares de caoba, B) Siembra de explantes en medio de cultivo.....	<b>30</b>
<b>Figura 4.</b>	A) Establecimiento y Germinación <i>in vitro</i> de semillas de caoba, B) formación de nuevos brotes en el medio con mejor respuesta.....	<b>30</b>
<b>Figura 5.</b>	Formación de brotes <i>in vitro</i> de caoba en el medio con mejor respuesta a los 60 días.....	<b>30</b>
<b>Figura 6.</b>	Respuesta de crecimiento en milímetros y formación de brotes obtenidos en número, de los tratamientos evaluados en caoba a los 60 días.....	<b>31</b>

<b>Figura 7.</b> Respuesta de crecimiento en caoba, mejor tratamiento izquierda y testigo derecha evaluados a los 60 días.....	<b>31</b>
--	-----------

## **RESUMEN**

Con objeto de generar tecnología que permita conservar a largo plazo germoplasma de especies forestales tropicales con semillas recalcitrantes como caoba (*Swietenia macrophylla*), a través de técnicas de cultivo de tejidos, se evaluaron las condiciones para el establecimiento, multiplicación y crecimiento mínimo. Para ello se probaron diferentes tipos de tejido (seminal y vegetativo) para ser usados como explantes iniciales, de igual manera fueron probados tres medios de cultivo y diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento para favorecer la formación de nuevos brotes. Finalmente se evaluaron factores limitantes del crecimiento *in vitro* (temperatura y carbohidratos del medio de cultivo). Durante el presente estudio fue posible establecer accesiones de caoba en condiciones *in vitro* y factible su micropropagación además de tener a la fecha datos de dos ensayos de crecimiento mínimo con una respuesta de reducción de crecimiento en condiciones *in vitro* significativa. Estos resultados promisorios pueden ser el inicio para poder generar Bancos de Germoplasma *in vitro* de caoba a corto plazo permitiendo el resguardo de material genético del país.

## INTRODUCCIÓN

Las especies forestales tropicales de explotación maderable en su mayoría poseen semillas recalcitrantes, motivo que impide su conservación en Bancos de Germoplasma convencionales (cámaras frías), debido a que al bajar la temperatura y contenido de humedad de las semillas se disminuye drásticamente la viabilidad y poder germinativo de las mismas, reduciendo el tiempo de conservación bajo estas condiciones a pocos meses. Razón por lo cual la conservación *in vitro* es una alternativa que permite conservar las características genéticas de los individuos y que a través de condiciones limitantes (crecimiento mínimo) pueden conservar a mediano y largo plazo las accesiones de éste tipo de especie. Como es el caso de *Swietenia macrophylla*, especie nativa maderable y considerada como madera preciosa por la calidad de la madera que se obtiene de ella; sin embargo, no es posible la conservación de sus semillas a largo plazo, motivos por los que se sugiere generar Bancos de Germoplasma *in vitro* ya que los tejidos en condiciones *in vitro* se pueden preservar de manera indefinida conservando sus características genéticas. Siendo los primeros pasos el desarrollo de protocolos de establecimiento y multiplicación *in vitro* y las condiciones óptimas para el crecimiento mínimo de plantas micropropagadas.

## OBJETIVOS

### General

- Generar un técnica de conservación a mediano plazo para especies forestales maderables con semillas recalcitrantes como caoba (*Swietenia macrophylla*), mediante protocolos de conservación *in vitro*, generando un modelo para el establecimiento de bancos de germoplasma *in vitro* de ésta especie.

### Específicos

- Generar protocolos para establecimiento *in vitro* de *Swietenia macrophylla*.
- Generar protocolos de crecimiento mínimo para *Swietenia macrophylla*.
- Contar con germoplasma de *Swietenia macrophylla* para su conservación *ex situ* a mediano y largo plazo.

## **METODOLOGÍA**

### **Recolección de material inicial para propagación**

La recolección inicial del material se realizó en rodales naturales de caoba en los estados de Chiapas y Quintana Roo. Se localizaron rodales, dentro de cada una de las localidades elegidas en los estados mencionados, se realizó una selección de fenotipos, consistió en identificar los mejores individuos con las características fenotípicas y sanidad óptimas (fuste recto, sin presencia de daños por enfermedad o plaga), de acuerdo al objetivo que se tiene para caoba, dentro los rodales naturales donde se distribuyen ecológicamente.

Cuando se toman muestras vegetativas de árboles adultos es de importancia mayor tomar en consideración la ontogenia de las estructuras del individuo, por lo que se recomienda siempre tomar las varetas del primer tercio.

### **Establecimiento del material inicial**

Una vez que el material vegetativo o seminal se traslada al laboratorio se revisó el estado en que éste llegó, en búsqueda de posibles contaminantes como hongos o bacterias, que pudieran estar presentes, posterior a la inspección visual y con base en los trabajos previamente realizados por Anwar *et. al.* (1985), se probaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio al 1.25 y 2.5 % adicionado con agente surfactante y se probaron cuatro tiempos de desinfección 5, 10, 15 y 20 minutos, para el establecimiento inicial a partir de yemas axilares, estableciendo 4 repeticiones por cada tratamiento. A su vez se establecieron yemas adventicias extraídas de las varetas recolectadas, se les dio un lavado con jabón comercial y agua corriente, para eliminar polvo y partículas adheridas a los tejidos, posteriormente se colocaron en los tratamientos, al término de cada uno de ellos, se realizaron tres enjuagues con agua destilada y esterilizada, bajo condiciones asépticas, en campana de flujo laminar, retirando el exceso de agua en toallas de papel esterilizadas y se sembraron en el medio correspondiente El material establecido se usó para los ensayos de multiplicación por organogénesis directa en caoba.



## **Multiplicación *in vitro***

Para la multiplicación *in vitro* se investigó la respuesta a la organogénesis directa a partir de meristemas en tres diferentes medios de cultivo MS, WPM y SH (ver anexo), con las combinaciones de reguladores de crecimiento siguientes: para formación de brotes adventicios BA, Kin y de raíces fue con ANA, AIA y AIB. Se establecieron bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial, donde a = es la especie caoba y b = es el regulador de crecimiento (BA, Kin), con cuatro repeticiones y tratadas con los diferentes reguladores, se sembraron en tubos de ensaye de acuerdo al diseño antes mencionado para el medio MS, repitiendo el mismo diseño con el medio WPM y SH. Se analizaron las respuestas en SAS mediante comparación de medias con un alfa de 0.05.

El presente estudio se realizó bajo el diseño siguiente:

$$2. \quad X_{ijk} = m + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

$X_{ijk}$  = observación cualquiera.

$m$  = efecto real de la media.

$A_i$  = efecto del nivel  $i$  ésima especie.

$B_j$  = efecto del nivel  $j$  ésimo regulador de crecimiento.

$(AB)_{ij}$  = efecto de la interacción del nivel  $i$  ésima especie con el nivel  $j$  ésimo regulador de crecimiento

$E_{ijk}$  = efecto aleatorio

## **Ensayos de crecimiento mínimo**

Se probaron tres temperaturas de conservación 24 (testigo) 18 y 16 °C además de modificar los medios de crecimiento adicionando manitol al 2.5, 5, 10, 15 y 20 g L<sup>-1</sup> y se realizaron evaluaciones del crecimiento cada 30 días para comparar el efecto de estos factores en el crecimiento (longitud de brotes en milímetros), de las accesiones previamente establecidas y multiplicadas *in vitro*.

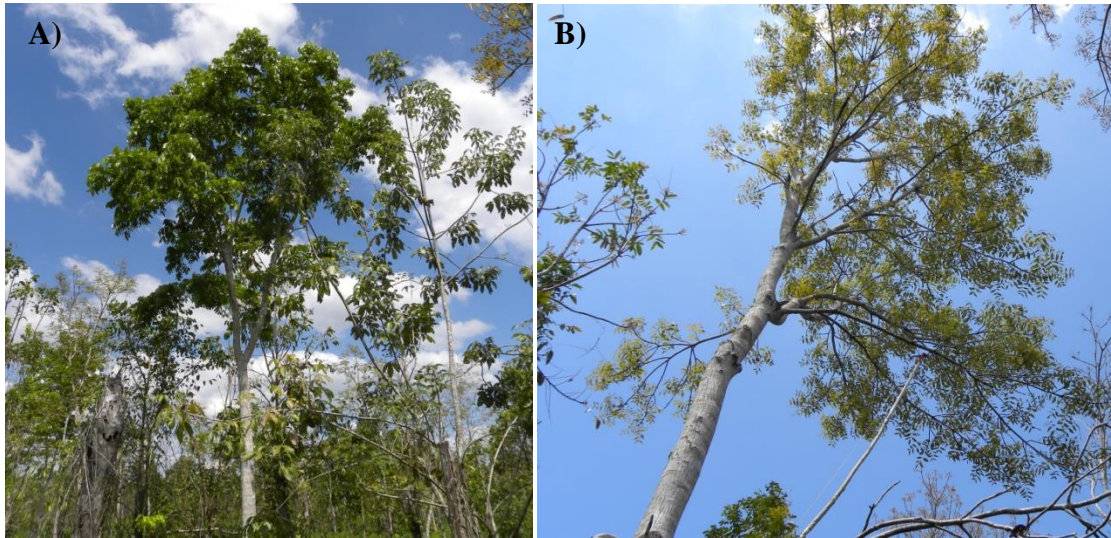
## RESULTADOS

### Recolección de material inicial para propagación

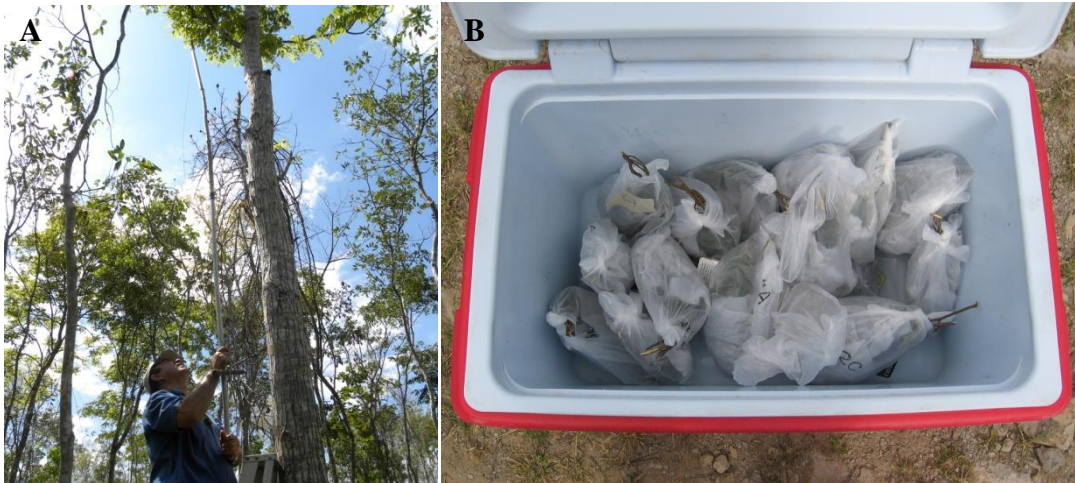
Se recolectaron muestras de material tanto vegetativo como seminal de caoba en los estados de Quintana Roo y Chiapas (Cuadro 1). Para el caso de meristemos se seccionaron ramas como varetas con un promedio de 25 cm de longitud y 6 a 8 meristemos por varetas, recolectando al menos 10 varetas por árbol. Con respecto a la recolecta de semilla se cosechó en promedio 900 gramos por árbol para las especies de semilla grande *Swietenia macrophylla* y se transportaron en hieleras selladas.

**Cuadro 1.** Número de accesiones recolectadas de caoba y establecidas *in vitro*

Nombre común/accesión	Especie	Localidad	<i>in vitro</i>
Caoba1	<i>Swietenia macrophylla</i>	Mpio. Bacalar P. Q. Roo	Establecida
Caoba2	<i>Swietenia macrophylla</i>	Mpio. Felipe Carrillo P. Q. Roo	Establecida
Caoba3	<i>Swietenia macrophylla</i>	Mpio. Othón P. Blanco, Q. Roo	Establecida
Caoba4	<i>Swietenia macrophylla</i>	Mpio. Tapachula Chiapas	Establecida
Caoba5	<i>Swietenia macrophylla</i>	Mpio. Cacahutan Chiapas	Establecida
Caoba6	<i>Swietenia macrophylla</i>	Mpio. Cacahutan Chiapas	Establecida
Caoba7	<i>Swietenia macrophylla</i>	Mpio. Othón P. Blanco, Q. Roo	Establecida
Caoba8	<i>Swietenia macrophylla</i>	Mpio. Felipe Carrillo P. Q. Roo	Establecida
Caoba9	<i>Swietenia macrophylla</i>	Mpio. Felipe Carrillo P. Q. Roo	Establecida
Caoba10	<i>Swietenia macrophylla</i>	Mpio. Othón P. Blanco, Q. Roo	Establecida



**Figura 1.** Selección de áreas e individuos para recolectar material vegetativo y seminal.



**Figura 2.** A) Selección y disección de varetas de los árboles seleccionados, B) Empacado en toallas de papel interdobladas absorbentes.

### **Establecimiento del material inicial para caoba (*Swietenia macrophylla*)**

Bajo estos sistemas se logró el establecimiento de los materiales con una sobrevivencia de más del 80 % tanto para material vegetativo como seminal. Cuando se usaron semillas como material inicial, cada lote pasó por el análisis de calidad de semilla de acuerdo a las reglas de ISTA, observándolas en la cámara de rayos X y se realizó prueba de germinación en cajas especiales (cajas rectangulares de plástico con tapa de cierre por fricción, con medidas de largo  $6 \frac{3}{4}$ "", ancho  $4 \frac{3}{4}$ " y alto  $2-3 \frac{3}{8}$ " de la marca SEEDBURO). Dentro de la caja se colocó sanitas húmedas y sobre las sanitas papel filtro húmedo, las cajas se colocaron dentro de una cámara de crecimiento con 16 horas de luz a una temperatura de

24 °C. A través de esta prueba se observó el estado físico de la semilla y el porcentaje de germinación. Derivado de los cuestionamientos en diferentes foros sobre la reducción de la diversidad genética al usar material únicamente vegetativo y con los fines de garantizar variabilidad en las accesiones resguardadas se usaron además de partes vegetativas, semillas como accesiones de colección núcleo (semilla proveniente de árboles representativos del rodal).

#### **Tren de desinfección para semillas de *Swietenia macrophylla*.**

24 horas de imbibición en agua bidestilada.

30 minutos en jabón Roma® 5 g/L.

2 horas en Captan® 3g/L.

2 minutos en Etanol 70%.

30 minutos en hipoclorito 30% (6% de cloro activo).

3 enjuagues en campana de flujo laminar con agua bidestilada estéril.

60 minutos en antioxidantes ácido cítrico 2.5 mg/L y ácido ascórbico 2.5 mg/L.

#### **Tren de desinfección para meristemos de *Swietenia macrophylla*.**

30 minutos en jabón Roma® 5 g/L.

1 enjuague con agua bidestilada

60 minutos en Captan® 3g/L

2 minutos en etanol 70%

8 minutos en hipoclorito 30% (6% de cloro activo)

3 enjuagues en campana de flujo laminar con agua bidestilada estéril

20 minutos en antioxidantes ácido cítrico 2.5 mg/L y ácido ascórbico 2.5 mg/L

#### **Multiplicación *in vitro***

De los diferentes medios probados para caoba a la fecha se han observado respuestas positivas de formación de nuevos brotes *in vitro*. La información del mejor medio y combinación de reguladores de crecimiento fue la siguiente:

**Cuadro 2.** Medio de cultivo para desarrollo y multiplicación de caoba *in vitro* evaluado a 30 días de su cultivo.

<b>Tratamiento</b> (Medio de cultivo)	<b>Tasa de multiplicación</b> (número de brotes por explante)	<b>Crecimiento</b> (Longitud en mm)
MS	3.9 a	59 a
WPM	2.7 b	42 b
SH	1.8 c	41 b

Letras desiguales para cada columna difieren para  $p < 0.05$  según prueba de Tukey.

**Cuadro 3.** Respuesta a formación de brotes de caoba con dos reguladores de crecimiento y diferentes concentraciones.

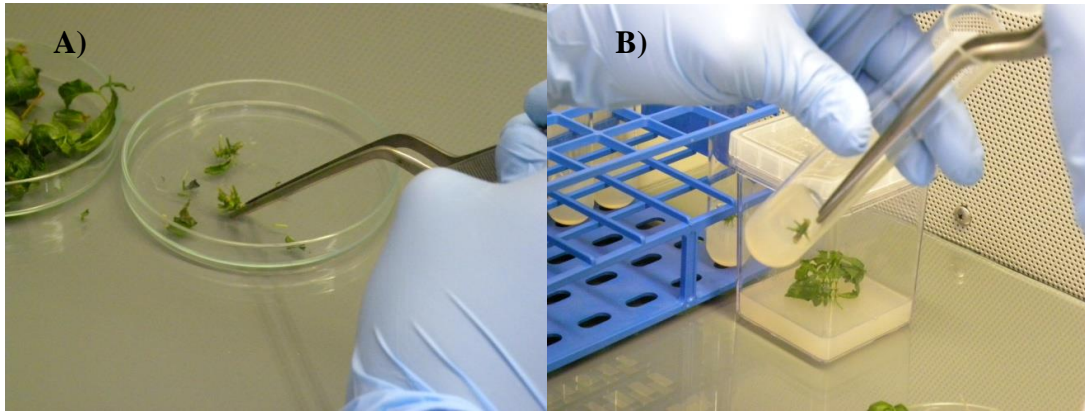
<b>Regulador</b> BA/ANA $\text{mgL}^{-1}$	<b>0</b>	<b>0.01</b>	<b>0.05</b>	<b>0.08</b>	<b>0.1</b>	<b>0.15</b>	<b>0.2</b>
<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>0.1</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>0.5</b>	0	0	0	0	0	0	0 R
<b>0.8</b>	0	0	1.11	1.23	1.17	0	0 R
<b>1.0</b>	0	0	1.77	1.89	1.33	1.09 C	0 CR
<b>1.5</b>	0	2.07	3.88	2.86	1.78 C	1.09 CR	0 C
<b>2.0</b>	0 C	1.15 C	1.89 C	1.76 CR	1.21 CR	1.03 CR	0 CR
<b>3.0</b>	0 C	0 C	1.13 C	0 C	0 CR	0CR	0 C

La letra C indica que se observó formación de callo en el tratamiento y la R que hubo presencia de raíces incipientes.

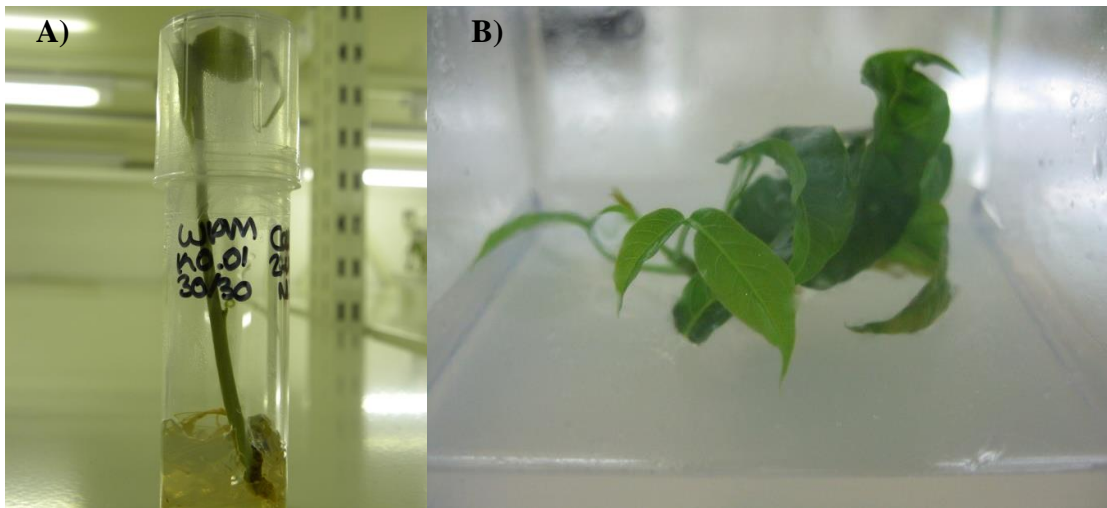
**Cuadro 4.** Medio de cultivo y combinación de reguladores de crecimiento para desarrollo y multiplicación de caoba *in vitro*.

<b>Especie</b>	<b>Medio de cultivo/Reguladores de crecimiento</b>
Caoba	MS y WP 100% + vitaminas, sacarosa 3%, BA 1.5 mg/l ANA 0.05 mg/l, carbón activado 3 g/l, pH 5.7 y Agar 9 g/l.

Se realizaron evaluaciones cada 30 días y se contabilizaron el número de brotes formados y la longitud, este proceso continúa.



**Figura 3.** A) Disección de segmentos nodales con meristemas axilares de caoba, B) Siembra de explantes en medio de cultivo.



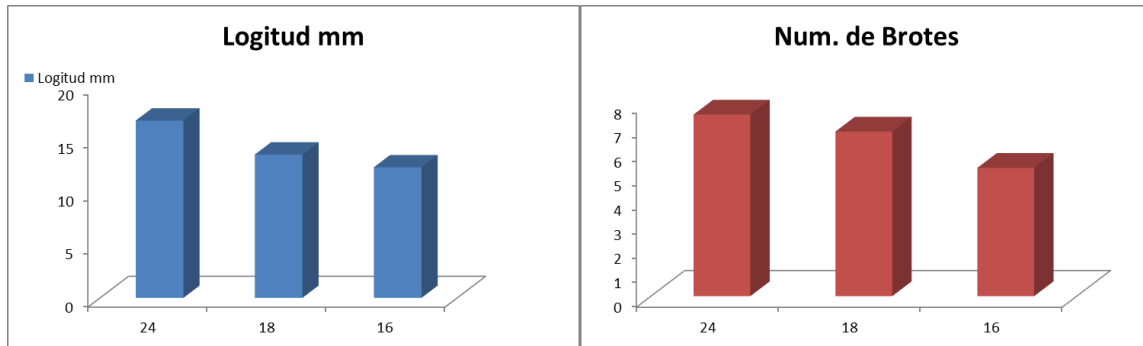
**Figura 4.** A) Establecimiento y Germinación *in vitro* de semillas de caoba, B) Formación de nuevos brotes en el medio con mejor respuesta.



**Figura 5.** Formación de brotes *in vitro* de caoba en el medio con mejor respuesta a 60 días.

### Crecimiento mínimo para caoba (*Swietenia macrophylla*).

En el caso de caoba las respuestas son similares al comportamiento observado en cedro rojo en cuanto a las temperaturas de conservación, en ambos casos, siendo 16 °C la temperatura que limita crecimiento, formación de brotes y longitud de los mismos.



**Figura 6.** Respuesta de crecimiento en milímetros y formación de brotes obtenidos en número, de los tratamientos evaluados en caoba a los 60 días.



**Figura 7.** Respuesta de crecimiento en caoba, mejor tratamiento izquierda y testigo derecha evaluados a los 60 días.

## CONCLUSIONES

- Se logró establecer de *Swietenia macrophylla in vitro* por medio de yemas vegetativas como de tejido seminal *in vitro*, con el medio MS y WPM 100% + vitaminas, sacarosa 3%, BA 1.5 mg/l y ANA 0.5 mg/l, carbón activado 3 g/l, pH 5.7 y Agar 9 g/l.
- Se tienen plántulas de *Swietenia macrophylla* en condiciones de crecimiento mínimo en evaluación.
- A los 60 días de evaluación se encontró que a temperatura de 16 °C se observó reducción significativa en la tasa de crecimiento.



## BIBLIOGRAFÍA

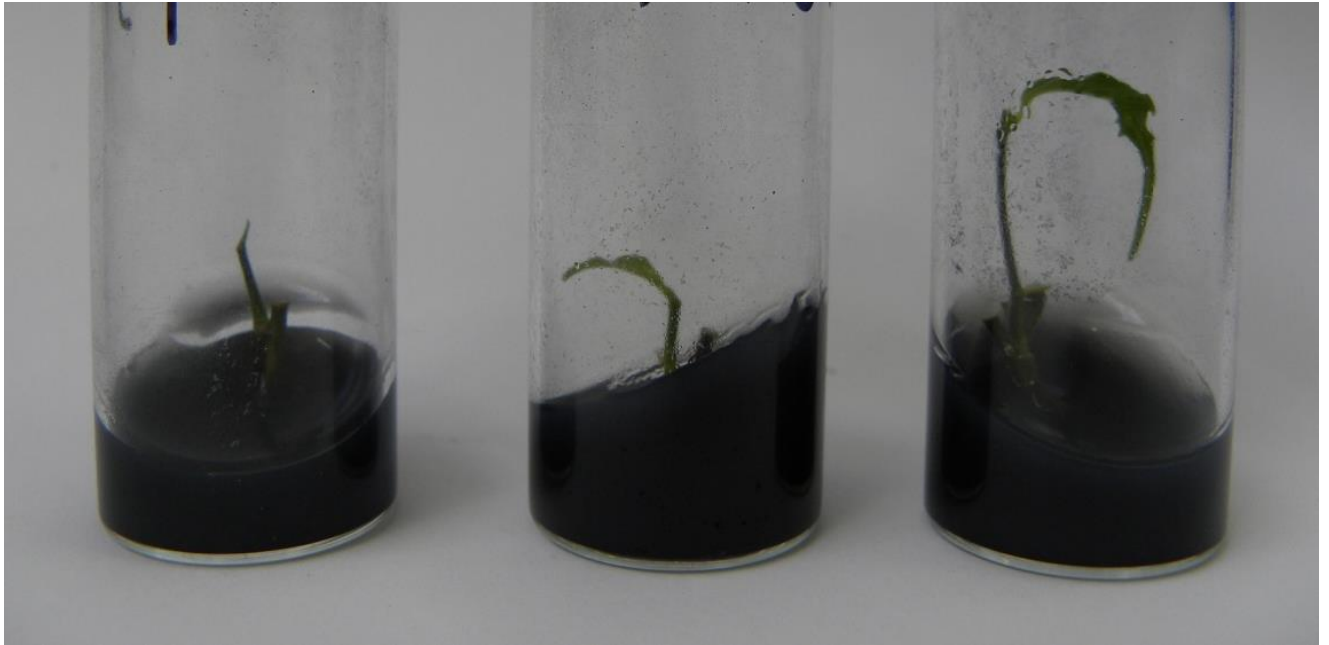
- Campell, R. and D. Durzan. 1975. Induction of multiple buds and needles on tissue cultures of *Picea glauca*. Canadian Journal of Botany. 53: 1652-1657.
- Day J. and G. Stacey. 2007. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Second Edition. Human Press. 348 pp.
- Joshi, I., P. Bisht., V. K. Sharma, and D.P. Uniyal. 2003. *In vitro* propagation of mature F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* SM. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). Silvae Genetica 52:3-4, 110-113.
- Murashige, I. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473- 497
- Park Y., J. Barret and J. Boga. 1998. Application of somatic embryogenesis in high value forestry: Development genetic control and statability of cryopreserved clones. *In vitro* Cell. Biol. 34:231-339.
- Rao P. S. and V. A. Bapat. 1993. Micropropagation of sandalwood (*Santlum album* L.) and mulberry (*Morus indica* L.). In: M. R. Ahuja (ed.). Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 317-345.
- Suhartono L., F. Van Iren, W. Winter and R. Verporte. 2005. Metabolic comparison of cryopreserved an normal cell from *Taberemontana divaricata* suspension cultures. Plant Tissue and Organ Culture. 83: 59–66.
- Scocchi, A. and L. Mroginski. 2004. *In vitro* conservation of apical meristem-tip of *Melia azedarach*. L. (Meliaceae) under slow-growth conditions. Phyton 137-143.
- Widiyanto, S. N., D. Erytrina and H. Rahmania. 2005. Adventitious shoot formation on teak (*Tectona grandis* L.f.) callus cultures derived from internodal segments. Acta Horticulturae 692: 153-157.

## ANEXO

Molecular formula	MW	Nombre (Español)	Nombre (Ingles)	Medio (mg/L)		
				MS	WPM	B5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80.04	Nitrato de Amonio	Ammonium Nitrate	1650	400	
KNO <sub>3</sub>	101.10	Nitrato de Potasio	Potassium Nitrate	1900		3000
KCl	74.55	Cloruro de Potasio	Pottasium Chloride			
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	174.26	Sulfato de Potasio	Pottasium Sulfate		990	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	147.01	Cloruro de Calcio	Calcium Chrolide Dihydrate	440	96	150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	132.14	Sulfato de Amonio	Ammonium Sulfate			134
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	236.15	Nitrato de Calcio	Calcium Nitrate Tetrahydrate		556	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	146.48	Sulfato de Magnesio	Magnesium sulfate Heptahydrate	370	370	250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	Fosfato Diácido de Potasio	Pottasium Dihydrogenphosphate	170	170	
NaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	156.01	Fosfato Diácido de Sodio dihidratado	Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate			169.6
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	278.02	Sulfato Ferrico heptahidratado	Iron Sulfate Heptahydrate	27.8	27.8	
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	399.88	Sulfato Ferrico	Iron (III) Sulfate			
Na <sub>2</sub> ·zEDTA	372.24	Sal disódica de Ácido Etilendiaminotetraacético	Ethylendiaminetetraacetic Acid Disodium Salt, 2-Hydrate	37.3	37.3	
MnSO <sub>4</sub> ·z4H <sub>2</sub> O	151.00	Sulfato de Magnesio	Manganese Sulfate Tetrahydrate	22.3	22.3 (H2O)	13.2 (H2O)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142.04	Sulfato de Sodio	Sodium Sulfate			
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	287.56	Sulfato de Zinc	Zinc Sulfate Heptahydrate	8.6 (4H2O)	8.6	2
FeNa-EDTA	367.05	Sal de fierro y sodio de Etilenendiaminotetraacético	Ethylendiaminetetraacetic Acid Monosodium Iron (III) Salt			40
CoCl <sub>2</sub> ·z6H <sub>2</sub> O	237.93	Cloruro de Cobalto	Cobalt (II) Chloride Hexahysrate	0.025		0.025
CuCl <sub>2</sub> ·z5H <sub>2</sub> O	249.68	Cloruro de Cobre	Copper (II) Chloride Pentahydrate	0.025	0.25	0.025
CuSO <sub>4</sub> ·z5H <sub>2</sub> O	249.68	Sulfato de Cobre (II) pentahidratado	Copper(II) sulfate Pentahydrate			
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·z2H <sub>2</sub> O	241.95	Molibdato de Sodio Dihidratado	Sodium Molybdate	0.25	0.25	0.25
KI	166.01	Yoduro de Potasio	Pottasium Iodide	0.83		0.75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.83	Ácido Bórico	Boric Acid	6.2		3
NaNO <sub>3</sub>	84.99	Nitrato de Sodio	Sodium Nitrate		6.2	
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	115.03	Fosfato Diácido de Amonio	Ammonium Dihydrogenphosphate			
C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> NCOOH	123.11	Ácido Nicotínico	Nicotinic Acid	0.5		1
C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ·zHCl	205.64	Hidroclorhidrato de Piridoxina	Pyridoxine Hydrochloride	0.5	0.5	1
C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>5</sub> ·zHCl	337.27	Hidroclorhidrato de Tiamina	Thiamine Hydrochloride	0.1	1	10
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> (OH) <sub>6</sub>	180.16	mic-Inositol	myo-Inositol	100	100	100
C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	441.40	Ácido Fólico	Folic Acid			
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	244.31	Biotina	Biotin			
[HOCH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(OH)CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO] <sub>2</sub>	476.54	Pantotenato de Calcio	Calcium (+) -Pantothenate			
H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> COOH	75.07	Glicina	Glycine	2	2	
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S·zHCl·zH <sub>2</sub> O	175.64	Hidroclorhidrato de Cisteina Monohidratado	Cysteine Hydrochloride Monohydrate			
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	342.30	Sacarosa	Sucrose	30000	20000	20000

**Protocolo de multiplicación y conservación *in vitro* de cuatro especies forestales tropicales de semillas recalcitrantes**

**CASO: Ramón (*Brosimum alicastrum*)**



**Participantes:**

**Dr. Carlos Roman Castillo Martínez**  
**Dra. Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez**  
**Dr. Carlos Hugo Avendaño Arrazate**  
**Mc. Bartolo Rodríguez Santiago**

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	38
INTRODUCCIÓN.....	39
OBJETIVOS.....	39
General.....	39
Específicos .....	39
METODOLOGÍA.....	40
Recolección de material inicial para propagación .....	40
Establecimiento del material inicial.....	40
Multiplicación <i>in vitro</i> .....	40
Ensayos de crecimiento mínimo .....	41
RESULTADOS .....	42
Establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> para ramón ( <i>Brosimum alicastrum</i> ).....	43
Tren de desinfección para semilla de <i>Brosimum alicastrum</i> . .....	43
Tren de desinfección para meristemos de <i>Brosimum alicastrum</i> . .....	44
Condiciones de crecimiento mínimo para ramón .....	46
CONCLUSIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA .....	49
ANEXO.....	50

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Número de accesiones recolectadas de ramón ( <i>Brosimum alicastrum</i> ) y establecidas <i>in vitro</i> .....	<b>42</b>
<b>Cuadro 2.</b>	Medio de cultivo para desarrollo y multiplicación de ramón <i>in vitro</i> evaluado a 30 días de su cultivo.....	<b>45</b>
<b>Cuadro 3.</b>	Respuesta a formación de brotes de ramón con dos reguladores de crecimiento y diferentes concentraciones.....	<b>45</b>
<b>Cuadro 4.</b>	Medio de cultivo y combinación de reguladores de crecimiento para desarrollo y multiplicación de ramón <i>in vitro</i> .....	<b>45</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Selección de áreas e individuos para recolectar material vegetativo y seminal.....	<b>43</b>
<b>Figura 2.</b>	A) Establecimiento y germinación <i>in vitro</i> de semillas de ramón, B) formación de brotes.....	<b>46</b>
<b>Figura 3.</b>	Respuesta de crecimiento en milímetros y formación de brotes obtenidos en número, de los tratamientos evaluados en ramón a los 30 días.	<b>47</b>
<b>Figura 4.</b>	Respuesta de crecimiento en ramón, mejor tratamiento izquierda y testigo derecha evaluados a los 30 días.....	<b>47</b>

## **RESUMEN**

Con objeto de generar tecnología que permita conservar a largo plazo germoplasma de especies forestales tropicales con semillas recalcitrantes a través de técnicas de cultivo de tejidos, se evaluaron las condiciones para el establecimiento, multiplicación y crecimiento mínimo para *Brosimum alicastrum*, la cual es una especie nativa de interés comercial por las características de su madera. Para ello se probaron diferentes tipos de tejido (seminal y vegetativo) para ser usados como explantes iniciales, de igual manera fueron probados cuatro medios de cultivo y diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento para favorecer la formación de nuevos brotes y finalmente se evaluaron factores limitantes del crecimiento *in vitro* (temperatura y carbohidratos del medio de cultivo). Durante el presente estudio fue posible establecer accesiones de ramón (*Brosimum alicastrum*) *in vitro* y su micropropagación. Estos resultados promisorios pueden ser el inicio para poder generar Bancos de Germoplasma *in vitro* de esta especie a corto plazo permitiendo el resguardo de material genético para el país.

## INTRODUCCIÓN

Las especies forestales tropicales de explotación maderable en su mayoría poseen semillas recalcitrantes, motivo que impide su conservación en Bancos de Germoplasma convencionales (cámaras frías), debido a que al bajar la temperatura y contenido de humedad de las semillas se disminuye drásticamente la viabilidad y poder germinativo de las mismas, reduciendo el tiempo de conservación bajo estas condiciones a pocos meses. Razón por lo cual la conservación *in vitro* es una alternativa que permite conservar las características genéticas de los individuos y que a través de condiciones limitantes (crecimiento mínimo) pueden conservar a mediano y largo plazo las accesiones de éste tipo de especies. Como es el caso de *Brosimum alicastrum* que es una especie nativa maderable y apreciada por la calidad de la madera que se obtiene de ella; sin embargo, no es posible la conservación de sus semillas a largo plazo, motivos por los que se sugiere generar Bancos de Germoplasma *in vitro* para su conservación, ya que los tejidos en condiciones *in vitro* se pueden preservar de manera indefinida conservando sus características genéticas. Siendo los primeros pasos el desarrollo de protocolos de establecimiento y multiplicación *in vitro* y las condiciones óptimas para el crecimiento mínimo de plantas micropropagadas.

## OBJETIVOS

### General

- Generar una técnica de conservación a mediano plazo en condiciones *in vitro*, para la especie forestal maderable ramón (*Brosimum alicastrum*) la cual tiene semillas recalcitrantes.

### Específicos

- Generar un modelo para el establecimiento *in vitro* de *Brosimum alicastrum*, para su conservación en bancos de germoplasma.
- Generar protocolos de crecimiento mínimo para *Brosimum alicastrum*.
- Contar con germoplasma de esta especie para su conservación *ex situ* a mediano y largo plazo.

## **METODOLOGÍA**

### **Recolección de material inicial para propagación**

La recolección inicial del material se realizó en rodales naturales forestales de los estados de Chiapas y Quintana Roo *Brosimum alicastrum*. Se localizaron rodales, dentro de cada una de las localidades elegidas en los estados mencionados, se realizó una selección de fenotipos que consistió en identificar los mejores individuos con las características fenotípicas y sanidad óptima (fuste recto, sin presencia de daños por enfermedad o plaga).

### **Establecimiento del material inicial**

Una vez que se recibió el material vegetativo o seminal se revisó el estado en que éste llegó, en búsqueda de posibles contaminantes como hongos o bacterias, que pudieran estar presentes, posterior a la inspección visual y con base en los trabajos previamente realizados por Anwar *et. al.* (1985), se probaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio al 1.25 y 2.5 % adicionado con agente surfactante y se probaron cuatro tiempos de desinfección 5, 10, 15 y 20 minutos, para el establecimiento inicial a partir de yemas axilares, estableciendo 4 repeticiones por cada tratamiento. A su vez se establecieron yemas adventicias extraídas de las varetas recolectadas, se les dio un lavado con jabón comercial y agua corriente, para eliminar polvo y partículas adheridas a los tejidos, posteriormente se colocaron en los tratamientos, al término de cada uno de ellos, se realizaron tres enjuagues con agua destilada y esterilizada, bajo condiciones asépticas, en campana de flujo laminar, retirando el exceso de agua en toallas de papel esterilizadas y se sembraron en el medio. El material establecido se usó para los ensayos de multiplicación para organogénesis directa.

### **Multiplicación *in vitro***

Para la multiplicación *in vitro* se investigó la respuesta a la organogénesis directa a partir de meristemas en tres diferentes medios de cultivo MS, WPM y SH (ver anexo) con las combinaciones de reguladores de crecimiento siguientes: para formación de brotes adventicios BA, Kin y de raíces fue con ANA, AIA y AIB. Se establecieron bajo un diseño



completamente al azar con un arreglo factorial, donde a = es la especie (Ramón) y b = es el regulador de crecimiento (BA, Kin), con cuatro repeticiones y tratadas con los diferentes reguladores, se sembraron en tubos de ensaye de acuerdo al diseño antes mencionado para el medio MS, repitiendo el mismo diseño con el medio WPM y SH. Se analizaron las respuestas en SAS mediante comparación de medias con un alfa de 0.05 mediante comparación de medias de la prueba de Tukey.

El presente estudio se realizó bajo el diseño siguiente:

$$3. \quad X_{ijk} = m + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

$X_{ijk}$  = observación cualquiera.

m = efecto real de la media.

$A_i$  = efecto del nivel i ésima especie.

$B_j$  = efecto del nivel j ésimo regulador de crecimiento.

$(AB)_{ij}$  = efecto de la interacción del nivel i ésima especie con el nivel j ésimo regulador de crecimiento

$E_{ijk}$  = efecto aleatorio

### **Ensayos de crecimiento mínimo**

Se probaron tres temperaturas de conservación 24 (testigo) 18 y 16 °C además de modificar los medios de crecimiento adicionando manitol al 2.5, 5, 10, 15 y 20 g L<sup>-1</sup> y se realizaron evaluaciones del crecimiento cada 30 días para comparar el efecto de estos factores en el crecimiento (longitud de brotes en milímetros) de las accesiones previamente establecidas y multiplicadas *in vitro*.

## RESULTADOS

Se recolectaron muestras de material tanto vegetativo como seminal de las especies seleccionadas de los estados de Quintana Roo y Chiapas (Cuadro 1). Para el caso de meristemos se seccionaron ramas como vareta con un promedio de 25 cm de longitud y 6 a 8 meristemos por vareta, recolectando al menos 10 varetas por árbol. Con respecto a la recolecta de semilla se cosechó en promedio 900 gramos por árbol, y se transportaron en hieleras selladas.

**Cuadro 1.** Número de accesiones colectadas de ramón (*Brosimum alicastrum*) y establecidas *in vitro*.

Nombre común/accesión	Especie	Localidad	<i>In Vitro</i>
Ramon1	<i>Brosimum alicastrum</i>	Mpio. Puerto Chiapas, Chiapas	Establecida
Ramon2	<i>Brosimum alicastrum</i>	Mpio. Bacalar P. Q. Roo	Establecida
Ramon3	<i>Brosimum alicastrum</i>	Mpio. Othón P. Blanco, Q. Roo	Establecida
Ramon4	<i>Brosimum alicastrum</i>	Mpio. Othón P. Blanco, Q. Roo	Establecida
Ramon5	<i>Brosimum alicastrum</i>	Mpio. Othón P. Blanco, Q. Roo	Establecida
Ramon6	<i>Brosimum alicastrum</i>	Mpio. Felipe Carrillo Pto., Q. Roo	Establecida
Ramon7	<i>Brosimum alicastrum</i>	Mpio. Felipe Carrillo Pto., Q. Roo	Establecida
Ramon8	<i>Brosimum alicastrum</i>	Mpio. Bacalar P. Q. Roo	Establecida
Ramon9	<i>Brosimum alicastrum</i>	Mpio. Bacalar P. Q. Roo	Establecida
Ramon10	<i>Brosimum alicastrum</i>	Mpio. Bacalar P. Q. Roo	Establecida



**Figura 1.** Selección de áreas e individuos para recolectar material vegetativo y seminal.

### **Establecimiento y Multiplicación *in vitro* para Ramón (*Brosimum alicastrum*)**

De los tratamientos de desinfección se logró el establecimiento de los materiales con una sobrevivencia de más del 80% tanto para material vegetativo como seminal. Cuando se usaron semillas como material inicial, cada lote pasó por el análisis de calidad de semilla (Observación en rayos X y pruebas de germinación) de acuerdo a los lineamientos de la ISTA, para conocer el estado físico de la semilla y el porcentaje de germinación. Derivado de los cuestionamientos en diferentes foros sobre la reducción de la diversidad genética al usar material únicamente vegetativo y con los fines de garantizar variabilidad en las accesiones resguardadas se usaron además de partes vegetativas semillas como accesiones de colección núcleo (semilla proveniente de árboles representativos del rodal).

#### **Tren de desinfección para semilla de *Brosimum alicastrum*.**

24 horas de imbibición en agua bidestilada.

30 minutos en jabón Roma® 5 g/L.

3 horas en Captan® 3g/L.

2 minutos en Etanol 70%.

30 minutos en hipoclorito 30% (6% de cloro activo).

3 enjuagues en campana de flujo laminar con agua bidestilada estéril.

60 minutos en antioxidantes ácido cítrico 2.5 mg/L y ácido ascórbico 2.5 mg/L.

**Tren de desinfección para meristemas de *Brosimum alicastrum*.**

30 minutos en jabón Roma® 5 g/L.

1 enjuague con agua bidestilada

60 minutos en Captan® 3g/L

2 minutos en etanol 70%

20 minutos en hipoclorito 30% (6% de cloro activo)

3 enjuagues en campana de flujo laminar con agua bidestilada estéril

20 minutos en antioxidantes ácido cítrico 2.5 mg/L y ácido ascórbico 2.5 mg/L

En cuanto a los diferentes medios evaluados se observó una respuesta positiva para la formación de nuevos brotes *in vitro*. Los resultados se observan en el cuadro 2,3 y 4.

**Cuadro 2.** Medio de cultivo para desarrollo y multiplicación de ramón *in vitro* evaluado a 30 días de su cultivo.

<b>Tratamiento (Medio de cultivo)</b>	<b>Tasa de multiplicación (número de brotes por explante)</b>	<b>Crecimiento (Longitud en mm)</b>
MS	1.8 a	46 a
WPM	1.3 b	37 b
SH	0.8 c	33 b

Letras desiguales para cada columna difieren para  $p < 0.05$  según prueba de Tukey.

**Cuadro 3.** Respuesta a formación de brotes de ramón con dos reguladores de crecimiento y diferentes concentraciones.

<b>Regulador BA/AIB mgL<sup>-1</sup></b>	<b>0</b>	<b>0.05</b>	<b>0.08</b>	<b>0.1</b>	<b>0.15</b>	<b>0.2</b>
<b>0</b>	0	0	0 R	0 RC	0 C	0 C
<b>0.5</b>	0	1.25	1.54	1.13 C	0 C	0 C
<b>0.8</b>	1.12	1.56	1.87	1.22 C	0 C R	0 C
<b>1.0</b>	1.35	1.56	1.28	0 C	0 C	0 C
<b>1.5</b>	1.12	1.26	1.08	0 C	0 C	0 C
<b>2.0</b>	1.07	1.38	0 C R	0 Cr	0 C	0 C

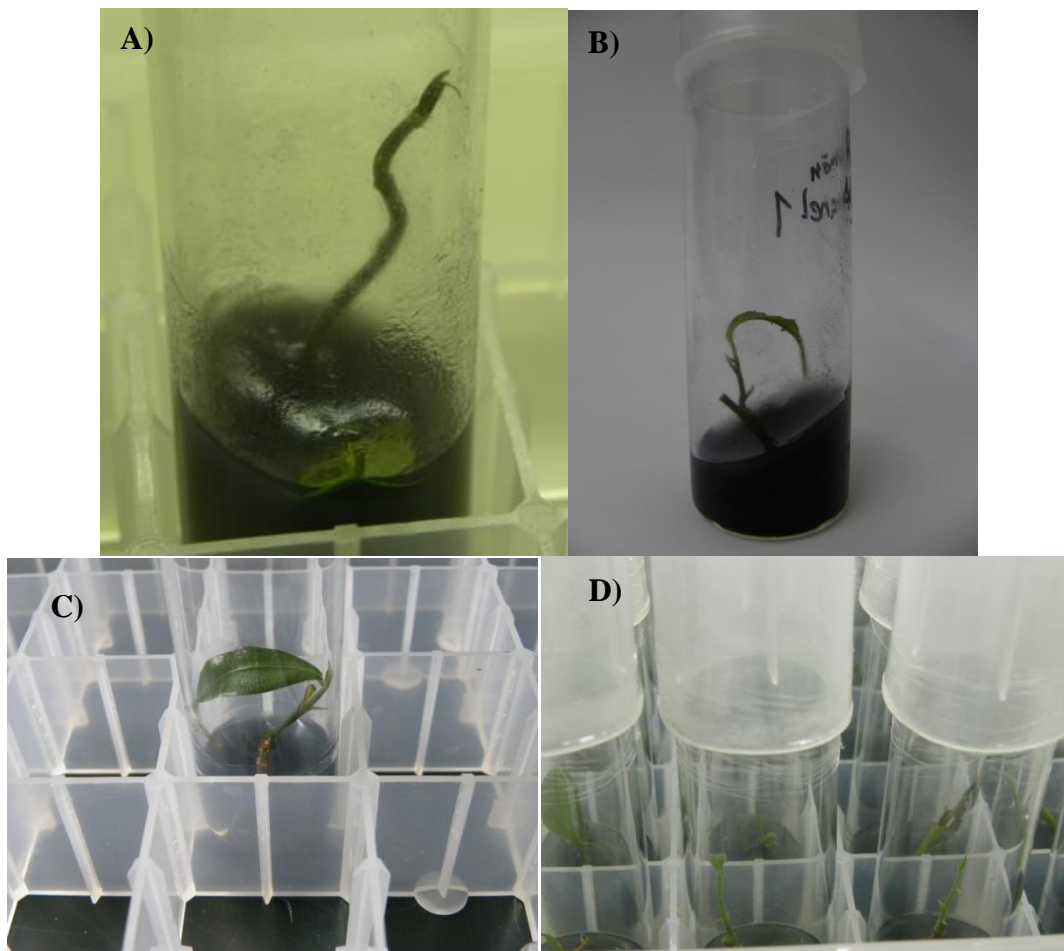
La letra C indica que se observó formación de callo en el tratamiento y la R que hubo presencia de raíces incipientes.

**Cuadro 4.** Medio de cultivo y combinación de reguladores de crecimiento para desarrollo y multiplicación de ramón *in vitro*.

<b>Especie</b>	<b>Medio de cultivo/Reguladores de crecimiento</b>
Ramón	MS 100% + vitaminas, sacarosa 3%, BA 0.8 mg/l, AIB 0.08 mg/l, carbón activado 3gr/l, pH 5.7 y Agar 9 gr/l.

Se realizaron evaluaciones cada 30 días y se contabilizó el número de brotes formados así como la longitud, este proceso continúa (Figura 2).



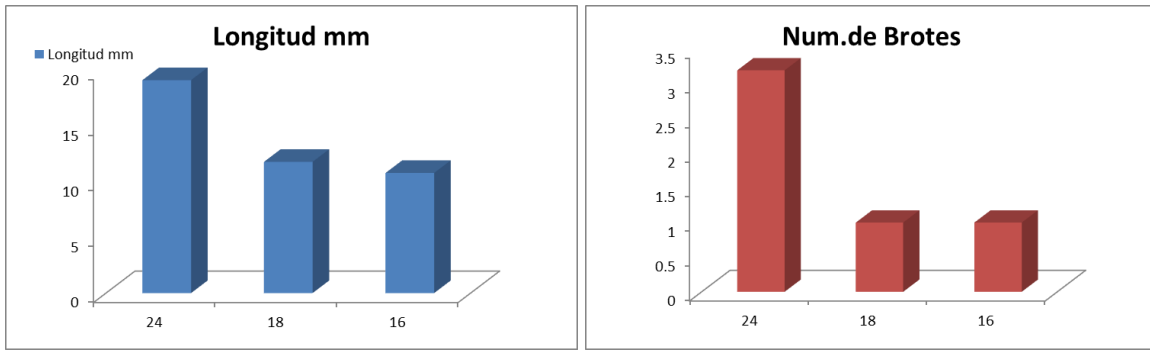


**Figura 2.** A y B) Establecimiento y germinación *in vitro* de semillas de ramón, C y D) Formación de brotes.

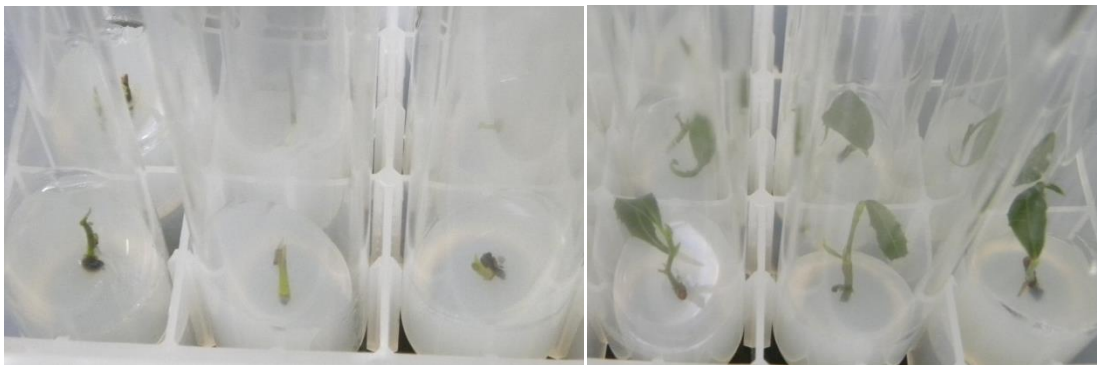
### **Condiciones de crecimiento mínimo para ramón**

De las tres temperaturas de conservación evaluadas 24 °C (testigo) 18 °C y 16 °C y de las modificaciones de los medios de crecimiento adicionando manitol al 2.5, 5, 10, 15 y 20 g L<sup>-1</sup> y se realizó la evaluación inicial a 30 días después del establecimiento (DDE) para comparar el efecto de estos factores en el crecimiento (longitud de brotes en milímetros y número de nuevas yemas formadas mismas que dan origen a nuevos brotes).

Se realizó la primera evaluación a los 30 DDE en condiciones de crecimiento mínimo (Figura 3).



**Figura 3.** Respuesta de crecimiento en milímetros y formación de brotes obtenidos en número, de los tratamientos evaluados en ramón a los 30 días.



**Figura 4.** Respuesta de crecimiento en ramón, mejor tratamiento izquierda y testigo derecha evaluados a los 30 días.



## CONCLUSIONES

- Se estableció *in vitro* material vegetativo y seminal, aumentando el número de accesiones de Ramón (*Brosimum alicastrum*) en el medio MS 100% + vitaminas, sacarosa 3%, BA 0.8 mg/l, AIB 0.08 mg/l, carbón activado 3 gr/l, pH 5.7 y Agar 9gr/l.
- Se tienen accesiones en condiciones de crecimiento mínimo considerando que la evaluación a los 30 días mostro el menor crecimiento se logró a 18 °C.

## BIBLIOGRAFÍA

- Campell, R. and D. Durzan. 1975. Induction of multiple buds and needles on tissue cultures of *Picea glauca*. Canadian Journal of Botany. 53: 1652-1657.
- Day J. and G. Stacey. 2007. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Second Edition. Human Press. 348 pp.
- Joshi, I., P. Bisht., V. K. Sharma, and D.P. Uniyal. 2003. *In vitro* propagation of mature F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* SM. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). Silvae Genetica 52:3-4, 110-113.
- Murashige, I. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473- 497
- Park Y., J. Barret and J. Boga. 1998. Application of somatic embryogenesis in high value forestry: Development genetic control and statability of cryopreserved clones. *In vitro* Cellular and Developmental Biology. 34:231-339.
- Rao P. S. and V. A. Bapat. 1993. Micropropagation of sandalwood (*Santlum album* L.) and mulberry (*Morus indica* L.). In: M. R. Ahuja (ed.). Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 317-345.
- Suhartono L., F. Van Iren, W. Winter and R. Verporte. 2005. Metabolic comparison of cryopreserved an normal cell from *Taberemontana divaricata* suspension cultures. Plant Tissue and Organ Culture. 83: 59–66.
- Scocchi, A. and L. Mroginski. 2004. *In vitro* conservation of apical meristem-tip of *Melia azedarach*. L. (Meliaceae) under slow-growth conditions. Phytion 137-143.
- Widiyanto, S. N., D. Erytrina and H. Rahmania. 2005. Adventitious shoot formation on teak (*Tectona grandis* L.f.) callus cultures derived from internodal segments. Acta Horticulturae 692: 153-157.

## ANEXO

Molecular formula	MW	Nombre (Español)	Nombre (Ingles)	Medio (mg/L)		
				MS	WPM	B5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80.04	Nitrato de Amonio	Ammonium Nitrate	1650	400	
KNO <sub>3</sub>	101.10	Nitrato de Potasio	Potassium Nitrate	1900		3000
KCl	74.55	Cloruro de Potasio	Pottasium Chloride			
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	174.26	Sulfato de Potasio	Pottasium Sulfate		990	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	147.01	Cloruro de Calcio	Calcium Chrolide Dihydrate	440	96	150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	132.14	Sulfato de Amonio	Ammonium Sulfate			134
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	236.15	Nitrato de Calcio	Calcium Nitrate Tetrahydrate		556	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	146.48	Sulfato de Magnesio	Magnesium sulfate Heptahydrate	370	370	250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	Fosfato Diácido de Potasio	Pottasium Dihydrogenphosphate	170	170	
NaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	156.01	Fosfato Diácido de Sodio dihidratado	Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate			169.6
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	278.02	Sulfato Ferrico heptahidratado	Iron Sulfate Heptahydrate	27.8	27.8	
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	399.88	Sulfato Ferrico	Iron (III) Sulfate			
Na <sub>2</sub> ·EDTA	372.24	Sal disódica de Ácido Etilendiaminetetraacético	Ethylendiaminetetraacetic Acid Disodium Salt, 2-Hydrate	37.3	37.3	
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	151.00	Sulfato de Magnesio	Manganese Sulfate Tetrahydrate	22.3 (H2O)	22.3 (H2O)	13.2 (H2O)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142.04	Sulfato de Sodio	Sodium Sulfate			
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	287.56	Sulfato de Zinc	Zinc Sulfate Heptahydrate	8.6 (4H2O)	8.6	2
FeNa-EDTA	367.05	Sal de fierro y sodio de Etilendiaminetetraacético	Ethylendiaminetetraacetic Acid Monosodium Iron (III) Salt			40
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	237.93	Cloruro de Cobalto	Cobalt (II) Chloride Hexahysrate	0.025		0.025
CuCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249.68	Cloruro de Cobre	Copper (II) Chloride Pentahydrate	0.025	0.25	0.025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249.68	Sulfato de Cobre (II) pentahidratado	Copper(II) sulfate Pentahydrate			
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	241.95	Molibdato de Sodio Dihidratado	Sodium Molybdate	0.25	0.25	0.25
KI	166.01	Yoduro de Potasio	Pottasium Iodide	0.83		0.75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.83	Ácido Bórico	Boric Acid	6.2		3
NaNO <sub>3</sub>	84.99	Nitrato de Sodio	Sodium Nitrate		6.2	
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	115.03	Fosfato Diacido de Amonio	Ammonium Dihydrogenphosphate			
C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> NCOOH	123.11	Ácido Nicotínico	Nicotinic Acid	0.5		1
C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ·HCl	205.64	Hidroclorhidrato de Piridoxina	Pyridoxine Hydrochloride	0.5	0.5	1
C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>5</sub> ·HCl	337.27	Hidroclorhidrato de Tiamina	Thiamine Hydrochloride	0.1	1	10
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> (OH) <sub>6</sub>	180.16	mio-Inositol	myo-Inositol	100	100	100
C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	441.40	Ácido Fólico	Folic Acid			
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	244.31	Biotina	Biotin			
[HOCH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(OH)CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO] <sub>2</sub>	476.54	Pantotenato de Calcio	Calcium (+) -Pantothenate			
H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> COOH	75.07	Glicina	Glycine	2	2	
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S·HCl·H <sub>2</sub> O	175.64	Hidroclorhidrato de Cisteina Monohidratado	Cysteine Hydrochloride Monohydrate			
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	342.30	Sacarosa	Sucrose	30000	20000	20000

**Protocolo de multiplicación y conservación *in vitro* de cuatro especies forestales tropicales de semillas recalcitrantes**

**CASO: Primavera (*Tabebuia rosea*)**



**Participantes:**

**Dr. Carlos Román Castillo Martínez  
Dra. Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez  
Dr. Carlos Hugo Avendaño Arrazate  
Mc. Bartolo Rodríguez Santiago**

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	54
INTRODUCCIÓN.....	55
OBJETIVOS.....	55
General.....	55
Específicos .....	55
METODOLOGÍA.....	56
Recolección de material inicial para propagación .....	56
Establecimiento del material inicial.....	56
Multiplicación <i>in vitro</i> .....	56
Recolecta de material vegetativo y seminal inicial de primavera ( <i>Tabebuia rosea</i> ) .....	58
Establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> de primavera ( <i>Tabebuia rosea</i> ).....	59
Tren de desinfección para semilla de <i>Tabebuia rosea</i> .....	60
Tren de desinfección para meristemos de <i>Tabebuia rosea</i> .....	60
RESULTADOS.....	61
CONCLUSIONES.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64
ANEXO.....	65

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Número de accesiones recolectadas de primavera ( <i>Tabebuia rosea</i> ) y establecidas <i>in vitro</i> .....	<b>58</b>
<b>Cuadro 2.</b>	Medio de cultivo para germinación <i>in vitro</i> de primavera evaluado a 30 días de su cultivo.....	<b>61</b>
<b>Cuadro 3.</b>	Medio de cultivo y combinación de reguladores de crecimiento para favorecer el desarrollo de primavera <i>in vitro</i> .....	<b>61</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Imágenes de rayos X de accesiones de primavera, izquierda sin desarrollo embrionario, derecha con embrión maduro.....	<b>59</b>
<b>Figura 2.</b>	Selección de áreas e individuos para recolectar de material vegetativo y seminal.....	<b>59</b>
<b>Figura 3.</b>	Establecimiento y germinación <i>in vitro</i> de semillas de primavera.....	<b>61</b>
<b>Figura 4.</b>	Contaminación y baja respuesta para el establecimiento de accesiones <i>in vitro</i> de primavera.....	<b>62</b>

## RESUMEN

Con objeto de generar tecnología que permita conservar a largo plazo germoplasma de especies forestales tropicales con semillas recalcitrantes a través de técnicas de cultivo de tejidos, se evaluaron las condiciones para el establecimiento, multiplicación y crecimiento mínimo de *Tabebuia rosea* especie nativa y de interés comercial por las características de su madera. Para ello se probaron diferentes tipos de tejido (seminal y vegetativo) para ser usados como explantes iniciales, de igual manera fueron probados tres medios de cultivo y diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento para favorecer la formación de nuevos brotes y finalmente se evaluaron factores limitantes del crecimiento *in vitro* (temperatura y carbohidratos del medio de cultivo). En el presente estudio se logró establecer *in vitro* tejido de primavera (*Tabebuia rosea*). Estos resultados promisorios pueden ser el inicio para poder generar Bancos de Germoplasma *in vitro* de diferentes especies forestales a corto plazo permitiendo el resguardo de material genético del país.

## INTRODUCCIÓN

Las especies forestales tropicales de explotación maderable en su mayoría poseen semillas recalcitrantes, que impide su conservación en Bancos de Germoplasma convencionales (cámaras frías), debido a que al bajar la temperatura y contenido de humedad de las semillas se disminuye drásticamente la viabilidad y poder germinativo de las mismas, reduciendo el tiempo de conservación bajo estas condiciones a pocos meses. Razón por lo cual la conservación *in vitro* es una alternativa que permite conservar las características genéticas de los individuos y que a través de condiciones limitantes (crecimiento mínimo) se pueden conservar a mediano y largo plazo las accesiones de éste tipo de especies, como es el caso de *Tabebuia rosea* la cual es una especie nativa maderable y apreciada por la calidad de la madera que se obtiene de ella; sin embargo, no es posible la conservación de sus semillas a largo plazo, motivos por los que se sugiere generar Bancos de Germoplasma *in vitro* como se realiza la conservación, ya que los tejidos en condiciones *in vitro* se pueden preservar de manera indefinida conservando sus características genéticas. Siendo los primeros pasos el desarrollo de protocolos de establecimiento y multiplicación *in vitro* y las condiciones óptimas para el crecimiento mínimo de plantas micropropagadas.

## OBJETIVOS

### General

- Generar una técnica de conservación a mediano plazo para *Tabebuia rosea* la cual tiene semillas recalcitrantes, mediante protocolos de conservación *in vitro*, generando un modelo para el establecimiento de Bancos de Germoplasma de ésta especie.

### Específicos

- Generar un protocolo para el establecimiento *in vitro* *Tabebuia rosea*.
- Generar protocolos de crecimiento mínimo para *Tabebuia rosea*.
- Contar con germoplasma suficiente para su micropropagación e incremento para su conservación *ex situ* a mediano y largo plazo.



## **METODOLOGÍA**

### **Recolección de material inicial para propagación**

La recolección inicial del material se realizó en rodales naturales forestales de los Estados de Chiapas y Quintana Roo. Se localizaron rodales, dentro de cada una de las localidades que se eligieron; se realizó una selección de fenotipos que consistió en identificar los mejores individuos con las características fenotípicas y sanidad óptimas (fuste recto, sin presencia de daños por enfermedad o plaga).

### **Establecimiento del material inicial**

Una vez que se recibió el material vegetativo o seminal se revisó el estado en que éste llegó, en búsqueda de posibles contaminantes como hongos o bacterias, que pudieran estar presentes, posterior a la inspección y con base en los trabajos previamente realizados por Anwar *et. al.* (1985), se probaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio al 1.25 y 2.5 % adicionado con agente surfactante y se probaron cuatro tiempos de desinfección 5, 10, 15 y 20 minutos, para el establecimiento inicial a partir de yemas axilares, estableciendo 4 repeticiones por cada tratamiento. A su vez se establecieron yemas adventicias extraídas de las varetas recolectadas, se les dio un lavado con jabón comercial y agua corriente, para eliminar polvo y partículas adheridas a los tejidos, posteriormente se colocaron en los tratamientos, al término de cada uno de ellos, se realizaron tres enjuagues con agua destilada y esterilizada, bajo condiciones asépticas, en campana de flujo laminar, retirando el exceso de agua en toallas de papel esterilizadas y se sembraron en el medio correspondiente. El material establecido se usó para los ensayos de multiplicación por organogénesis directa de *Tabebuia rosea*.

### **Multiplicación *in vitro***

Para la multiplicación *in vitro* se investigó la respuesta a la organogénesis directa a partir de meristemas en tres diferentes medios de cultivo MS, WPM y SH (ver anexo) con las combinaciones de reguladores de crecimiento siguientes: para formación de brotes adventicios BA, Kin y de raíces será con ANA, AIA y AIB. Se establecieron bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial, donde a = es la especie primavera y b = es el regulador de crecimiento (BA, Kin), con cuatro repeticiones y tratadas con los diferentes

reguladores, se sembraron en tubos de ensayo de acuerdo al diseño antes mencionado para el medio MS, repitiendo el mismo diseño con el medio WPM y SH. Se analizaron las respuestas en SAS mediante comparación de medias con un alfa de 0.05

El presente estudio se realizó bajo el diseño siguiente:

$$4. \quad X_{ijk} = m + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

$X_{ijk}$  = observación cualquiera.

$m$  = efecto real de la media.

$A_i$  = efecto del nivel  $i$  ésima especie.

$B_j$  = efecto del nivel  $j$  ésimo regulador de crecimiento.

$(AB)_{ij}$  = efecto de la interacción del nivel  $i$  ésima especie con el nivel  $j$  ésimo regulador de crecimiento

$E_{ijk}$  = efecto aleatorio

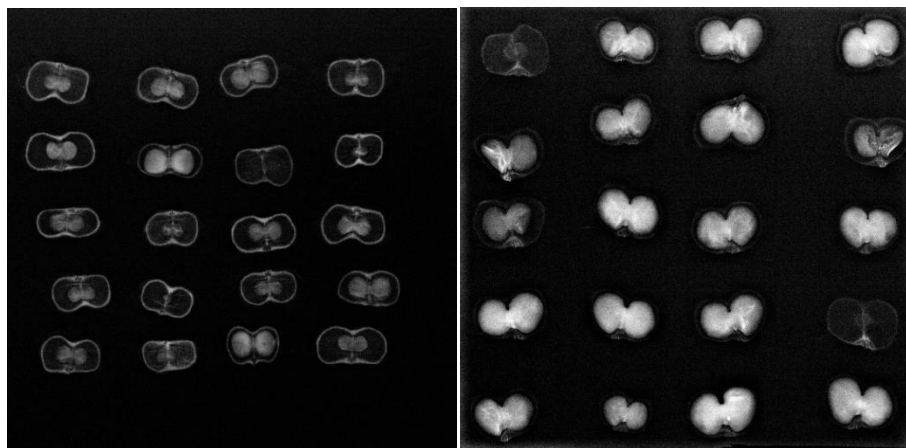
### Recolecta de material vegetativo y seminal inicial de primavera (*Tabebuia rosea*)

Se recolectaron muestras de material tanto vegetativo como seminal en los estados de Quintana Roo y Chiapas (Cuadro 1). Para el caso de meristemos se seccionaron ramas como varetas con un promedio de 25 cm de longitud y 6 a 8 meristemos por varetas, recolectando al menos 10 varetas por árbol. Con respecto a la recolecta de semilla se cosecho en promedio 250 gramos por árbol ya que esta especie tiene semilla pequeña y se transportó en hieleras selladas.

**Cuadro 1.** Número de accesiones recolectadas de primavera (*Tabebuia rosea*) y establecidas *in vitro*.

Nombre común/accesión	Especie	Localidad	<i>In Vitro</i>
Primavera1	<i>Tabebuia rosea</i>	Mpio. Puerto Chiapas, Chiapas	No establecida
Primavera2	<i>Tabebuia rosea</i>	Mpio. Cacahutan Chiapas	No establecida
Primavera3	<i>Tabebuia rosea</i>	Mpio. Tapachula Chiapas	No establecida
Primavera4	<i>Tabebuia rosea</i>	Mpio. Cacahutan Chiapas	No establecida
Primavera5	<i>Tabebuia rosea</i>	Mpio. Tapachula Chiapas	No establecida
Primavera6	<i>Tabebuia rosea</i>	Mpio. Felipe Carrillo P. Q. Roo	Establecida
Primavera7	<i>Tabebuia rosea</i>	Mpio. Felipe Carrillo P. Q. Roo	Establecida
Primavera8	<i>Tabebuia rosea</i>	Mpio. Felipe Carrillo P. Q. Roo	Establecida
Primavera9	<i>Tabebuia rosea</i>	Mpio. Felipe Carrillo P. Q. Roo	Establecida
Primavera10	<i>Tabebuia rosea</i>	Mpio. Othón P. Blanco, Q. Roo	Establecida

Se observó que las accesiones que no respondieron presentaron viabilidad nula, derivado de la incompleta maduración del embrión dentro de la semilla, posiblemente causado por estrés ambiental (falta de humedad en la etapa de maduración) o cosecha prematura.



**Figura 1.** Imágenes de rayos X de accesiones de primavera, izquierda sin desarrollo embrionario, derecha con embrión maduro.



**Figura 2.** Selección de áreas e individuos para recolectar de material vegetativo y seminal

### **Establecimiento y multiplicación *in vitro* de primavera (*Tabebuia rosea*)**

Bajo estos sistemas se logró el establecimiento de los materiales con una sobrevivencia de menos del 50 % para seminal. Cuando se usaron semillas como material inicial, cada lote pasó por el análisis de calidad de semilla (observación en rayos X y pruebas de germinación), de acuerdo con las normas establecidas por la ISTA, para conocer el estado físico de la semilla y el porcentaje de germinación. Derivado de los cuestionamientos en diferentes foros sobre la reducción de la diversidad genética al usar material únicamente vegetativo y con los fines de garantizar variabilidad en las accesiones resguardadas se usaron además de partes vegetativas semillas como accesiones de colección núcleo (semilla proveniente de árboles representativos del rodal).

**Tren de desinfección para semilla de *Tabebuia rosea*.**

24 horas de imbibición en agua bidestilada.

30 minutos en jabón Roma® 5 g/L.

3 horas en Captan® 3g/L.

2 minutos en Etanol 70%.

30 minutos en hipoclorito 30% (6% de cloro activo).

3 enjuagues en campana de flujo laminar con agua bidestilada estéril.

30 minutos en antioxidantes ácido cítrico 2.5 mg/L y ácido ascórbico 2.5 mg/L.

**Tren de desinfección para meristemos de *Tabebuia rosea*.**

30 minutos en jabón Roma® 5 g/L.

1 enjuague con agua bidestilada.

60 minutos en Captan® 3g/L.

2 minutos en etanol 70%.

20 minutos en hipoclorito 30% (6% de cloro activo).

3 enjuagues en campana de flujo laminar con agua bidestilada estéril.

20 minutos en antioxidantes ácido cítrico 2.5 mg/L y ácido ascórbico 2.5 mg/L.

## RESULTADOS

De los diferentes medios evaluados para esta especie, hasta el momento se ha observado un efecto positivo en cuanto a la formación de nuevos brotes *in vitro*. La información de los mejores medios y combinación de reguladores de crecimiento se observan en el cuadro 2 y 3.

**Cuadro 2.** Medio de cultivo para germinación *in vitro* de primavera evaluado a 30 días de su cultivo.

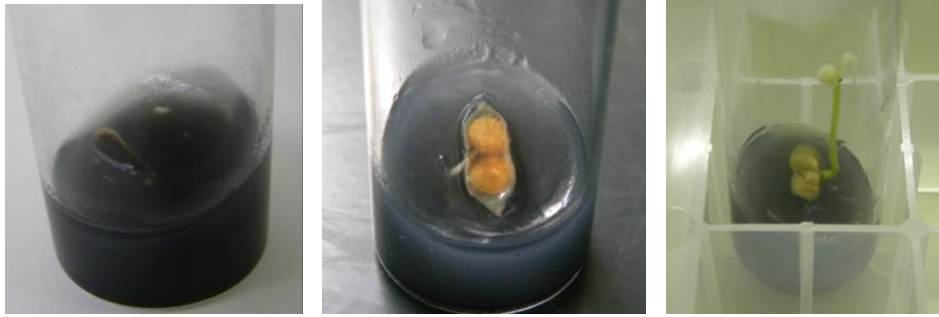
<b>Tratamiento</b> (Medio de cultivo)	<b>Germinación</b> (semillas germinadas)	<b>Crecimiento</b> (Longitud en mm)
MS	88.6 a	67 a
WPM	74.3 b	64 a
SH	76.5 b	49 b

Letras desiguales para cada columna difieren para  $p < 0.05$  según prueba de Tukey.

**Cuadro 3.** Medio de cultivo y combinación de reguladores de crecimiento para favorecer el desarrollo de primavera *in vitro*.

<b>Especie</b>	<b>Medio de cultivo/Reguladores de crecimiento</b>
Primavera	WPM 100% + vitaminas, sacarosa 3%, KIN 0.5 mg/l más AIA 0.05 mg/l, carbón activado 3 gr/l, pH 5.7 y Agar 9 gr/l.

Se utilizó este medio como promotor de desarrollo para favorecer el crecimiento de las plántulas iniciales para incrementar el número de yemas axilares y apicales con objeto de generar suficientes explantes para un ensayo posterior con diferentes concentraciones, derivado de la baja respuesta de ésta especie a su establecimiento *in vitro*.



**Figura 3.** Establecimiento y germinación *in vitro* de semillas de primavera.



**Figura 4.** Contaminación y baja respuesta para el establecimiento de accesiones *in vitro* de primavera.

Además de los problemas derivados de la baja germinación por embriones inmaduros en elevada proporción del material inicial, se observó una alta contaminación de los materiales iniciales tanto por hongos como bacterias de tipo endógena (izquierda). Para descartar el efecto de la luz sobre la germinación se colocaron muestras en oscuridad (centro) y en sustrato (derecha), sin obtener respuesta (figura 4).

## CONCLUSIONES

- Se estableció *in vitro* *Tabebuia rosea* con las limitantes y resultados mencionados anteriormente, se seguirá incrementando el número de accesiones de tejido seminal con el medio WPM 100% + vitaminas, sacarosa 3%, KIN 0.5 mg/l más AIA 0.05 mg/l, carbón activado 3 gr/l, pH 5.7 y Agar 9 gr/l. como medio inicial para favorecer el desarrollo de nuevas yemas.
- Por el momento se tiene material en desarrollo, para disponer de suficiente material de *Tabebuia rosea*, con el fin de establecer los ensayos de multiplicación *in vitro* y crecimiento mínimo.



## BIBLIOGRAFÍA

- Campell, R. and D. Durzan. 1975. Induction of multiple buds and needles on tissue cultures of *Picea glauca*. Canadian Journal of Botany. 53: 1652-1657.
- Day J. and G. Stacey. 2007. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Second Edition. Human Press. 348 pp.
- Joshi, I., P. Bisht., V. K. Sharma, and D.P. Uniyal. 2003. *In vitro* propagation of mature F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* SM. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). Silvae Genetica 52:3-4, 110-113.
- Murashige, I. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473- 497
- Park Y., J. Barret and J. Boga. 1998. Application of somatic embryogenesis in high value forestry: Development genetic control and statability of cryopreserved clones. *In vitro* Cell. Biol. 34:231-339.
- Rao P. S. and V. A. Bapat. 1993. Micropropagation of sandalwood (*Santlum album* L.) and mulberry (*Morus indica* L.). In: M. R. Ahuja (ed.). Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 317-345.
- Suhartono L., F. Van Iren, W. Winter and R. Verporte. 2005. Metabolic comparison of cryopreserved an normal cell from *Taberemontana divaricata* suspension cultures. Plant Tissue and Organ Culture. 83: 59–66.
- Scocchi, A. and L. Mroginski. 2004. *In vitro* conservation of apical meristem-tip of *Melia azedarach*. L. (Meliaceae) under slow-growth conditions. Phytion 137-143.
- Widiyanto, S. N., D. Erytrina and H. Rahmania. 2005. Adventitious shoot formation on teak (*Tectona grandis* L.f.) callus cultures derived from internodal segments. Acta Horticulturae 692: 153-157.

## ANEXO

Molecular formula	MW	Nombre (Español)	Nombre (Ingles)	Medio (mg/L)		
				MS	WPM	B5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80.04	Nitrato de Amonio	Ammonium Nitrate	1650	400	
KNO <sub>3</sub>	101.10	Nitrato de Potasio	Potassium Nitrate	1900		3000
KCl	74.55	Cloruro de Potasio	Pottasium Chloride			
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	174.26	Sulfato de Potasio	Pottasium Sulfate		990	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	147.01	Cloruro de Calcio	Calcium Chrolide Dihydrate	440	96	150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	132.14	Sulfato de Amonio	Ammonium Sulfate			134
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	236.15	Nitrato de Calcio	Calcium Nitrate Tetrahydrate		556	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	146.48	Sulfato de Magnesio	Magnesium sulfate Heptahydrate	370	370	250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	Fosfato Diácido de Potasio	Pottasium Dihydrogenphosphate	170	170	
NaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	156.01	Fosfato Diácido de Sodio dihidratado	Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate			169.6
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	278.02	Sulfato Ferrico heptahidratado	Iron Sulfate Heptahydrate	27.8	27.8	
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	399.88	Sulfato Ferrico	Iron (III) Sulfate			
Na <sub>2</sub> ·EDTA	372.24	Sal disódica de Ácido Etilendiaminetetraacético	Ethylendiaminetetraacetic Acid Disodium Salt, 2-Hydrate	37.3	37.3	
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	151.00	Sulfato de Magnesio	Manganese Sulfate Tetrahydrate	22.3	22.3 (H2O)	13.2 (H2O)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142.04	Sulfato de Sodio	Sodium Sulfate			
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	287.56	Sulfato de Zinc	Zinc Sulfate Heptahydrate	8.6 (4H2O)	8.6	2
FeNa-EDTA	367.05	Sal de fierro y sodio de Etilendiaminetetraacético	Ethylendiaminetetraacetic Acid Monosodium Iron (III) Salt			40
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	237.93	Cloruro de Cobalto	Cobalt (II) Chloride Hexahydrate	0.025		0.025
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	249.68	Cloruro de Cobre	Copper (II) Chloride Pentahydrate	0.025	0.25	0.025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249.68	Sulfato de Cobre (II) pentahidratado	Copper(II) sulfate Pentahydrate			
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	241.95	Molibdato de Sodio Dihidratado	Sodium Molybdate	0.25	0.25	0.25
KI	166.01	Yoduro de Potasio	Pottasium Iodide	0.83		0.75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.83	Ácido Bórico	Boric Acid	6.2		3
NaNO <sub>3</sub>	84.99	Nitrato de Sodio	Sodium Nitrate		6.2	
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	115.03	Fosfato Diácido de Amonio	Ammonium Dihydrogenphosphate			
C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> NCOOH	123.11	Ácido Nicotínico	Nicotinic Acid	0.5		1
C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ·HCl	205.64	Hidroclorhidrato de Piridoxina	Pyridoxine Hydrochloride	0.5	0.5	1
C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>5</sub> ·HCl	337.27	Hidroclorhidrato de Tiamina	Thiamine Hydrochloride	0.1	1	10
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> (OH) <sub>6</sub>	180.16	mio-Inositol	myo-Inositol	100	100	100
C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	441.40	Ácido Fólico	Folic Acid			
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	244.31	Biotina	Biotin			
[HOCH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(OH)CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO] <sub>2</sub>	476.54	Pantotenato de Calcio	Calcium (+) -Pantothenate			
H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> COOH	75.07	Glicina	Glycine	2	2	
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> ·HCl·H <sub>2</sub> O	175.64	Hidroclorhidrato de Cisteina Monohidratado	Cysteine Hydrochloride Monohydrate			
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	342.30	Sacarosa	Sucrose	30000	20000	20000