

Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de *Cedrus atlantica* mediante yemas axilares*

Preliminary study for *in vitro* propagation of *Cedrus atlantica* through axillary buds

Alejandra María Montes-Salazar¹, Gabriela Sepúlveda-Jiménez², Silvia Evangelista-Lozano y Mario Rodríguez-Monroy^{2§}

¹Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia. Carrera 78 No 65-46 Robledo, Medellín, Colombia. Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia. Carrera 78 No 65-46 Robledo, Medellín, Colombia (alejita.montes@hotmail.com). ²Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional. CEPROBI-IPN. Calle CEPROBI 8. Col. San Isidro. Yautepec, Morelos. México CP. 62730. Tel. +527353942020 (gsepulvedaj@ipn.mx; sevangel@ipn.mx). [§]Autor para correspondencia: mrmonroy@ipn.mx.

Resumen

Cedrus atlantica es una planta ornamental utilizada para la decoración de parques y jardines. Con el fin de micropropagar material de calidad de esta planta, se implementó un protocolo de multiplicación *in vitro*. Para ello, como explantes se usaron las yemas axilares que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% por 15 min, tratamiento con lo que se obtuvo un 83% de material aséptico. El cultivo de los explantes se realizó en el medio basal McCown's Woody Plant (WPM) adicionado con carbón activado (1 g L^{-1}) y cisteína (25 mg L^{-1}), lo que permitió obtener cultivos sin rasgos de oxidación. En la etapa de multiplicación con el uso de la bencil amino purina (5 mg L^{-1}) se obtuvieron hasta 5 brotes por explante, que presentaron un crecimiento de 1.4 cm. Sin embargo, el ácido indol butírico a 2.5 y 5 mg L^{-1} no indujo la formación de raíces en los brotes *in vitro*.

Palabras clave: cedro, brotación, micropropagación, plantas leñosas.

Introducción

Cedrus atlantica es una especie arbórea perteneciente a la familia Pinacea conocido como el verdadero cedro. La planta se introdujo a México como una planta ornamental.

Abstract

Cedrus atlantica is an ornamental plant used to decorate parks and gardens. In order to micropropagate quality material of this plant, an *in vitro* multiplication protocol was implemented. For this, the axillary buds were used as explants which were disinfected with sodium hypochlorite 10% for 15 min, treatment with which obtained 83% aseptic material. Explants culture was performed in the basal medium McCown's Woody Plant (WPM) added with activated carbon (1 g L^{-1}) and cysteine (25 mg L^{-1}), which allowed to obtain crops without oxidation features. In the multiplication stage with the use of benzyl amino purine (5 mg L^{-1}) obtained up to 5 shoots per explant, which showed an increase of 1.4 cm. However, indole butyric acid at 2.5 and 5 mg L^{-1} did not induce root formation *in vitro* shoots.

Keywords: cedar, bud, micropropagation, woody plants.

Introduction

Cedrus atlantica is a species belonging to the family pinacea known as true cedar. The plant was introduced to Mexico as an ornamental plant. The tree can reach 30 to 40 m high (Pijut, 2000), its wood possesses excellent characteristics to

* Recibido: octubre de 2016
Aceptado: diciembre de 2016

El árbol puede alcanzar 30 a 40 m de altura (Pijut, 2000), su madera posee características excelentes para ser usada en la construcción, la artesanía y la industria. El aceite esencial de ésta planta tiene actividad antifúngica contra *Penicillium digitatum* (Chebli *et al.*, 2004), antimicrobiana contra *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y citotóxica contra diversas líneas de cáncer (Barrero *et al.*, 2005).

La propagación de *C. atlantica* se realiza por semillas; sin embargo, la producción de semillas es irregular y las semillas son escasas. Una alternativa para multiplicar especies arbóreas de difícil reproducción es el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Las características que presenta el cultivo *in vitro* para la multiplicación de plantas son: a) el uso de pequeños segmentos de la planta, que son el punto de partida para el inicio del cultivo; b) se obtiene un gran número de plántulas en corto tiempo y con características fenotípicas y genotípicas similares a la planta madre; c) el crecimiento es continuo a lo largo del año y no se ve afectado por variaciones climáticas; d) se requiere poco espacio y mantenimiento para la propagación que los métodos tradicionales; y e) se asegura la calidad sanitaria de las plantas (Evans, 2003).

Los sistemas de propagación de plantas *in vitro* han sido utilizados exitosamente para la multiplicación de varias especies ornamentales, pero su aplicación en especies arbóreas está limitada, debido a los problemas de oxidación que se presenta en los explantes; por lo que se requiere implementar los protocolos para la desinfección y multiplicación de las plantas (Orellana, 1998). Particularmente, para la familia Pinaceae existen antecedentes del empleo de estas técnicas para la propagación de algunas especies como: *Pinus maximartinezii* (Zacarias *et al.*, 2006; Paz *et al.*, 2009), *Pinus pseudostrobus* y *Pinus jaliscana* (Rebolledo *et al.*, 2006); *Pinus roxburghii* (Arya *et al.*, 2000); *Picea chihuahuana* (López *et al.*, 2000), pero solo se documenta la propagación *in vitro* de *Cedrus deodara* (Rebolledo *et al.*, 2006).

En los reportes anteriores, se documenta que la vía de micropropagación es por organogénesis, con tasas de multiplicación de 3 hasta 29 brotes por explante, además es frecuente el uso de agentes antioxidantes para evitar la oxidación de los tejidos, como es el empleo del ácido ascórbico y carbón activado. También se reporta que es posible obtener embriogénesis en cultivos de *Pinus cubensis* (Cantillo *et al.* 2011); sin embargo, aunque se obtiene callo embriogénico y embriones en estadios de desarrollo I y II, no se logró completar el proceso de propagación.

be used in construction, crafts and industry. The essential oil of this plant has antifungal activity against *Penicillium digitatum* (Chebli *et al.*, 2004), antimicrobial against *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and cytotoxic against various cancer lines (Barrero *et al.*, 2005).

C. atlantica propagation is by seed; however, seed production is irregular and seeds are scarce. An alternative to multiply tree species difficult to reproduce is the use of plant tissue culture. The characteristics of *in vitro* culture for plant multiplication are: a) use of small segments of the plant, which are the starting point to initiate the culture; b) a large number of seedlings are obtained in a short time and with phenotypic and genotypic characteristics similar to the mother plant; c) growth is continuous throughout the year and is not affected by climatic variations; d) little space and maintenance is required for propagation than traditional methods; and e) the sanitary quality of plants is ensured (Evans, 2003).

The *in vitro* propagation system have been successfully used for the multiplication of several ornamental species, but its application in tree species is limited due to oxidation problems present in the explants; so it is required to implement the disinfection and multiplication of plants protocols (Orellana, 1998). Particularly for the Pinaceae family there is a history of the use of these techniques for the propagation of some species such as *Pinus maximartinezii* (Zacarias *et al.*, 2006 Paz *et al.*, 2009), *Pinus pseudostrobus* and *Pinus jaliscana* (Rebolledo *et al.*, 2006); *Pinus roxburghii* (Arya *et al.*, 2000); *Picea chihuahuana* (López *et al.*, 2000); but only *in vitro* propagation of *Cedrus deodara* is documented (Rebolledo *et al.*, 2006).

In previous reports, it is documented that micropropagation is through organogenesis, with multiplication rates of 3 to 29 shoots per explant, it is also frequent the use of antioxidants to prevent tissue oxidation, as is the use of ascorbic acid and activated carbon. It is also reported that it is possible to obtain embryogenesis in cultures of *Pinus cubensis* (Cantillo *et al.*, 2011); however, although embryogenic callus and embryos are obtained in developmental stages I and II, it was not possible to complete the propagation process.

Previous studies show that it is technically feasible to obtain *in vitro* plants mainly from the genus *Pinus*, however for *Cedrus atlantica* are not reported *in vitro* cultures. So in this work was raised as a target, to implement a protocol

Lo estudios anteriores, muestran que es factible técnicamente obtener plantas *in vitro* principalmente del género *Pinus*, sin embargo para *Cedrus atlantica*, no se reportan cultivos *in vitro*. Por lo que en este trabajo se planteó como objetivo, implementar un protocolo para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Cedrus atlantica* y su multiplicación por medio de brotes adventicios que sirvan para la micropropagación de esta especie.

Materiales y métodos

Material vegetal

Plantas de *C. atlantica* de 50 cm de altura fueron proporcionados por el Vivero el Solitario de Cuautla, Morelos, México. Estas plantas se mantuvieron en cuarentena en el vivero del CEPROBI-IPN en Yautepec, estado de Morelos, México. A las plantas se les aplicó una solución antifúngica y bactericida cada dos días, durante 15 días. La solución contenía Agri-mycin® 1.5 g L⁻¹ y Benlate® 0.8 g L⁻¹.

Establecimiento del cultivo axénico

La desinfección del material vegetal de *C. atlantica*, se realizó por la metodología reportada para *Pinus pseudostrobus* y *Pinus jaliscana* (Rebolledo *et al.*, 2011). La cual consistió en utilizar 80 explantes de la planta formados por segmentos de yemas axilares de 1 cm. El material fue lavado en agua jabonosa durante 15 min; los explantes fueron tratados con alcohol etílico al 50% durante 30 segundos y tres enjuagues con agua destilada estéril. Después los explantes se sumergieron en hipoclorito de sodio grado reactivo (Hycel, HY57011019000) al 10% v/v durante 15 min, con una gota de Tween 20. Los explantes se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

El medio de cultivo utilizado para la siembra de los explantes fue el medio basal McCown's Woody Plant WPM (McCown y Lloyd, 1981), suplementado con 2.7 g L⁻¹ de phytigel. El pH del medio se ajustó a 5.7 y se sirvió en frascos tipo Gerber, con 30 mL de medio. El material se esterilizó en una autoclave a 120 °C y 15 libras durante 20 min. En total se sembraron 25 frascos, cada uno con 3 explantes. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 25 ± 3 °C, con un fotoperíodo de 16 h luz: 8 h oscuridad, con una intensidad lumínica de 11.14 μmol m⁻² s⁻¹. Después de 5 días de cultivo, se realizó la determinación del porcentaje de contaminación: considerando la relación de explantes

for the establishment of *in vitro* culture of *Cedrus atlantica* and its multiplication by adventitious buds that serve for micropropagation of this species.

Materials and methods

Vegetative material

C. atlantica plants of 50 cm height were provided by the Nursery El Solitario from Cuautla, Morelos, Mexico. These plants were kept in quarantine in the nursery from CEPROBI-IPN in Yautepec, State of Morelos, Mexico. The plants were applied with an antifungal and antibacterial solution every two days for 15 days. The solution contained Agri-Mycin® 1.5 g L⁻¹ and Benlate® 0.8 g L⁻¹.

Establishment of axenic culture

Disinfection of *C. atlantica* was conducted by the methodology reported for *Pinus pseudostrobus* and *Pinus jaliscana* (Rebolledo *et al.*, 2011); which consisted on using 80 plant explants formed by segments of axillary buds of 1 cm. The material was washed in soapy water for 15 min; Explants were treated with 50% ethyl alcohol for 30 seconds and three rinses with sterile distilled water; afterwards explants were immersed in reagent grade sodium hypochlorite (Hycel, HY57011019000) 10% v/v for 15 min, with a drop of Tween 20. The explants were rinsed three times with sterile distilled water.

The culture medium used to grow the explants was the basal medium McCown's Woody Plant WPM (Lloyd and McCown, 1981) supplemented with 2.7 g L⁻¹ phytigel. The pH of the medium was adjusted to 5.7 and poured in Gerber type flasks with 30 ml of the medium. The material was sterilized in an autoclave at 120 °C and 15 lbs for 20 min. In total 25 bottles, each with 3 explants was planted. The cultures were incubated at a temperature of 25 ± 3 °C with a photoperiod of 16 h light: 8 h dark with light intensity of 11.14 μmol m⁻² s⁻¹. After 5 days of culture, the determination of contamination percentage was performed: considering the relationship contaminated explants on total explants planted. In addition oxidation frequency of explants was documented.

Induction of multiple bud outbreaks

To induce multiple outbreaks, apical buds obtained after the disinfection process were used. Explants were inoculated in the culture medium WPM supplemented with sucrose

contaminados entre el total de explantes sembrados. Además se documentó la frecuencia de oxidación en los explantes.

Inducción de brotación múltiple

Para inducir brotación múltiple, se utilizaron las yemas apicales obtenidas después del proceso de desinfección. Los explantes se inocularon en el medio de cultivo WPM suplementado con sacarosa al 3%, carbón activado 1 g L⁻¹ y cisteína 25 mg L⁻¹, con phytigel 2.7 g L⁻¹. Se ensayó el efecto de la citocinina bencil amino purina (BAP) en concentraciones de 3 y 5 mg L⁻¹. Se sembraron tres explantes por frasco con tres repeticiones por tratamiento. Después de 21 días, se midió los parámetros morfométricos: crecimiento del explante y número de brotes.

Enraizamiento

Se utilizaron brotes obtenidos de la etapa de multiplicación, los explantes a enraizar se inocularon en el medio de cultivo WPM suplementado con 2.5 y 5 mg L⁻¹ de la auxina ácido indolbutírico (AIB). Se sembraron 10 frascos por tratamiento con 3 explantes por frasco.

Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de varianza. Para establecer diferencias entre los tratamientos, se aplicó la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$ empleando el software estadístico JMP 10.0.

Resultados y discusión

Desinfección y establecimiento *in vitro*

El tratamiento de desinfección en los explantes de yemas apicales de *C. atlantica* utilizando en este trabajo con hipoclorito de sodio y alcohol, permitió obtener 83% de explantes sin contaminación, solo 17% de los explantes presentaron contaminación por hongos después del 5° día (Figura 1). En las yemas apicales sin contaminación no se presentó oxidación y solamente los explantes contaminados presentaron oxidación. En la Figura 1 se observa la planta madre de *C. atlantica* utilizada, así como las diferentes etapas del establecimiento del cultivo.

3%, activated carbon 1 g L⁻¹ and L-cysteine 25 mg L⁻¹, with phytigel 2.7 g L⁻¹. The effect of the cytokinin benzyl amino purine (BAP) in concentrations of 3 and 5 mg L⁻¹ was tested. Three explants were cultured per flask with three replicates per treatment. After 21 days, the morphometric parameters measured were: explant growth and number of outbreaks.

Rooting

Shoots obtained from the multiplication stage were used; explants to be rooted were inoculated in the culture medium WPM supplemented with 2.5 and 5 mg L⁻¹ of auxin indole butyric acid (IBA). 10 bottles per treatment with 3 explants per bottle were cultured.

Statistical analysis

Statistical processing of the experimental data was performed through an analysis of variance. To establish differences between treatments, Tukey test was applied with a significance level of $p < 0.05$ using the JMP statistical software 10.0.

Results and discussion

Disinfection and *in vitro* establishment

The disinfection treatment in explants of apical buds from *C. atlantica* used in this work consisted on washing with sodium hypochlorite and alcohol, allowed to obtain 83% of explants without pollution, only 17% of explants showed fungal contamination after the 5th day (Figure 1). In the unpolluted apical buds there was no oxidation and only polluted explants showed oxidation. Figure 1 shows the mother plant of *C. atlantica* used, as well as the different stages of culture establishment.

The disinfection method of apical buds of *C. atlantica* can be considered satisfactory, considering that the tissue did not show damage and contamination rate was 17%. This result is consistent with that reported by Rebolledo *et al.* (2006), who tested the same disinfectant agents and immersion times but in seeds of *Pinus jaliscana* and *Pinus pseudostrobus*. For other pinus species also reported the use of other disinfecting agents with which obtained satisfactory results such as mercuric chloride (Tamta and Palmi 2004; Oliveira *et al.*, 2011) and hydrogen peroxide (Arya *et al.*, 2000; Zacarias *et al.*, 2006; Robledo *et al.*, 2009).

El método de desinfestación de las yemas apicales de *C. atlantica* puede considerarse satisfactorio, considerando que el tejido no presentó daño y que el porcentaje de contaminación fue del 17 %. Este resultado es consistente con el reportado por Rebolledo *et al.* (2006), quienes ensayaron los mismos agentes desinfectantes y tiempos de inmersión pero en semillas de *Pinus jaliscana* y *Pinus pseudostrobus*. Para otras especies de *Pinus* también se reporta el uso de otros agentes desinfectantes con los que se obtienen resultados satisfactorios como es el cloruro de mercurio (Tamta y Palmi 2004; Oliveira *et al.*, 2011) y el peróxido de hidrógeno (Arya *et al.*, 2000; Zacarias *et al.*, 2006; Robledo *et al.*, 2009).

En la micropropagación de especies leñosas, uno de los factores que limita el desarrollo de la técnica es el corte o la lesión de los tejidos, ya que se genera la oxidación de los mismos. Por tal motivo, durante el establecimiento de sus cultivos *in vitro* uno de los aspectos a controlar es el desarrollo del proceso de oxidación. La elección de un medio de cultivo adecuado y el uso de agentes antioxidantes son dos consideraciones importantes para la sobrevivencia de los explantes de yemas apicales en los cultivos *in vitro*. Para las yemas apicales de *C. atlantica*, el medio de cultivo WPM junto con el carbón activado y cisteína, resultaron adecuados para evitar el proceso de oxidación de los explantes. Este resultado es consistente con el reportado para *Cedrus deodara* (Tamta y Palmi, 2004), en donde se evitó la oxidación de los explantes usando el medio WPM en combinación con el ácido ascórbico. También es consistente con lo reportado por Rebolledo *et al.* (2006), quienes también usaron el medio WPM para *Pinus pseudostrobus* y *Pinus jaliscana*, en combinación con ácido ascórbico y ácido cítrico. También en otros trabajos se reporta el uso de medios como el Murashige y Skoog MS (1962) y el de Schenk y Hildebrandt SH (1972), ampliamente usados en cultivos vegetales *in vitro* para especies no leñosas. Para *Pinus cubensis* se reportó el uso del medio MS sin agentes antioxidantes (Cantillo *et al.*, 2011) y para *Picea chihuahuana* se empleó el medio SH adicionado con ácido ascórbico y ácido cítrico (López *et al.*, 2000).

Multiplicación por brotación múltiple de *Cedrus atlantica*

En el Cuadro 1 se observa que la presencia de la BAP en el medio de cultivo, estimuló la brotación en *C. atlantica* en las dos de las concentraciones evaluadas (3 y 5 mg L⁻¹). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el número de brotes. También se observó que el BAP estimula

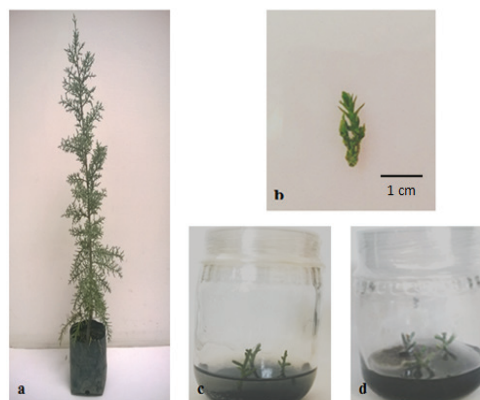


Figura 1. Establecimiento del cultivo *in vitro* de *Cedrus atlantica*: planta madre (a) explantes de yemas apicales; (b) cultivos *in vitro* sin contaminación; y (c) cultivos contaminados por hongos (d).

Figure 1. Establishment of *in vitro* culture of *Cedrus atlantica*: mother plant (a) explants of apical buds; (b) *in vitro* cultures without pollution; and (c) contaminated cultures by fungus (d).

In micropropagation of woody species, one factor limiting the development of the technique is the cut or tissue injury, since the oxidation thereof is generated. Therefore, during the establishment of their *in vitro* cultures an aspect to control is the development of the oxidation process. Choosing a suitable culture medium and the use of antioxidants are two important considerations for the survival of apical bud explants of *in vitro* cultures. For apical buds of *C. atlantica*, the culture medium WPM along with activated carbon and cysteine, turned adequate to prevent explant oxidation. This result is consistent with that reported for *Cedrus deodara* (Tamta and Palmi, 2004) where explant oxidation was avoided using the WPM medium in combination with ascorbic acid. It is also consistent with that reported by Rebolledo *et al.* (2006), who also used the WPM medium for *Pinus pseudostrobus* and *Pinus jaliscana*, in combination with ascorbic and citric acid. Also in other studies using mediums such as Murashige and Skoog MS (1962) and Schenk and Hildebrandt SH (1972), widely used *in vitro* plant cultures for non-woody species is reported. For *Pinus cubensis* is reported the used the MS medium without antioxidants agents (Cantillo *et al.*, 2011) and for *Picea chihuahuana* the SH medium supplemented with ascorbic and citric acid was used (López *et al.*, 2000).

Multiplying by multiple sprouting of *Cedrus atlantica*

Table 1 show that the presence of BAP in the culture medium stimulated sprouting in *C. atlantica* in both concentrations evaluated (3 and 5 mg L⁻¹). However, no significant

la elongación de los brotes, que presentaron hasta 1.53 cm de longitud, pero con las dos concentraciones de BAP que se usaron, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de los brotes (Figura 2).

Cuadro 1. Efecto la citocinina bencil amino purina (BAP) en la brotación múltiple de yemas de *Cedrus atlantica*.

Table 1. Effect the benzyl amino purine (BAP) in multiple sprouting of *Cedrus atlantica*.

BAP (mg L ⁻¹)	Núm. de brotes	Longitud del brote (cm)
0	2.77 ± 0.83 a*	0.08 ± 0.16 a
3	4.44 ± 0.88 b	1.53 ± 0.22 b
5	4.88 ± 0.92 b	1.43 ± 0.92 b

*Letras diferentes en cada columna indican que existen diferencias significativas. Prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

El efecto de la BAP sobre la brotación múltiple que se obtuvo en éste trabajo, es consistente con los reportes de otros autores en plantas de la familia Pinacea. López *et al.* (2000) reportaron para *Picea chihuahuana*, que con la adición de 3.5 mg L⁻¹ de kinetina se producen siete brotes por explante; Oliveira *et al.* (2011) reportaron que 0.4 mg L⁻¹ de bencil adenina (BA) puede generar tres brotes por explante en cultivos *in vitro* de *Pinus taeda*.

Sin embargo, el número de brotes que se obtuvo de *C. atlantica* en éste trabajo está por debajo de los reportados para *Pinus maximartinezzi*, en donde se reportó que la adición de BA en una concentración de 16 mg L⁻¹ produce la formación de 29 brotes por explante Robledo *et al.* (2009); mientras que BA a una concentración de 1.1 mg L⁻¹ también se producen de 7 a 50 brotes por explante de *Cedrus deodara* (Tamta y Palni, 2004). De esta manera se evidencia la importancia de las citocininas en el metabolismo de las Pinacea para inducir el proceso de brotación múltiple.

Enraizamiento

En esta investigación las concentraciones del ácido indol butírico (AIB) empleadas para *C. atlantica* no fueron las más adecuadas, debido a que no formó raíz, solamente se observó la presencia de callos en los explantes sembrados (Figura 3). Este resultado es consistente con lo reportado en la literatura, donde se observa que la inducción de enraizamiento *in vitro* son bajos en comparación con los tratamientos *ex vitro*. Asimismo, Hartmann *et al.* (2002) consideran que la etapa de enraizamiento representa a menudo la fase crítica y difícil

differences were observed in the number of outbreaks. It was also observed that BAP stimulate shoot elongation, showing up to 1.53 cm in length, but with the two concentrations of BAP used, no significant difference in the buds size were observed (Figure 2).

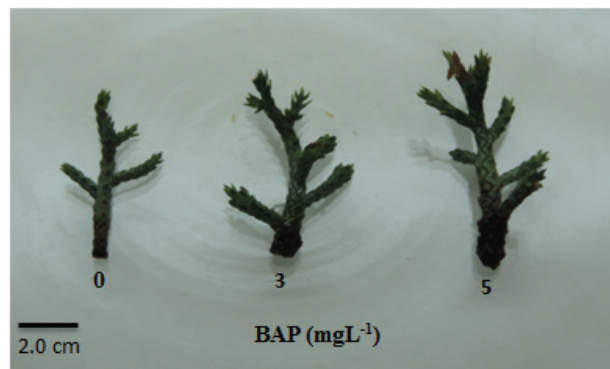


Figura 2. Efecto de la citocinina bencil amino purina (BAP) en la brotación múltiple de yemas de *Cedrus atlantica*.
Figure 2. Effect of benzyl amino purine (BAP) in multiple sprouting from apical buds of *Cedrus atlantica*.

The effect of BAP on multiple sprouting obtained in this work is consistent with the reports of other authors in plants of the pinacea family. López *et al.* (2000) reported for *Picea chihuahuana*, that with the addition of 3.5 mg L⁻¹ of kinetin seven shoots per explant are produced; Oliveira *et al.* (2011) reported that 0.4 mg L⁻¹ of benzyl adenine (BA) can generate three shoots per explant *in vitro* cultures of *Pinus taeda*.

However, the number of outbreaks obtained from *C. atlantica* in this work is below those reported for *Pinus maximartinezzi*, where it was reported that the addition of BA at a concentration of 16 mg L⁻¹ produced 29 outbreaks per explant Robledo *et al.* (2009); while BA at a concentration of 1.1 mg L⁻¹ also produces from 7 to 50 outbreaks per explant of *Cedrus deodara* (Tamta and Palni, 2004). It is evident the importance of cytokinins in the metabolism of pinacea to induce the multiple sprouting process.

Rooting

In this study the concentrations of indole butyric acid (IBA) were used for *C. atlantica* were not optimal, because it did not formed root, only the presence of callus was observed in explants cultured (Figure 3). This result is consistent with that reported in the literature, which shows that the induction of *in vitro* rooting are low compared to *ex vitro* treatments. In addition, Hartmann *et al.* (2002) consider that the rooting

en los protocolos de micropopagación de la mayoría de las especies leñosas. Al respecto Paz *et al.* (2009) reportaron que en *P. maximartinezii*, solo se logró inducir 3% de formación de raíces en los brotes con una concentración de 3 mg L⁻¹ de AIB. Una alternativa para mejorar el proceso de enraizamiento de las plántulas de *C. atlantica* podría ser el empleo de IBA en combinación con ANA. Esto considerando los resultados reportados *Pinus cubensis* (Oliveira *et al.* 2011), ellos reportan que la combinación de 1.8 mg L⁻¹ de ácido naftalen áctico (ANA) y 2.03 mg L⁻¹ AIB favorece la formación del 47% de raíces, sin la formación de callo.

Conclusión

En éste estudio se reporta un protocolo para obtener un cultivo *in vitro* de *C. atlantica* a partir de yemas axilares. El medio de cultivo que se usa es el WPM con la adición de carbón activado y cisteína con lo que se obtiene un cultivo *in vitro* sin rasgos de oxidación y con potencial para la generación de brotes en presencia de la citocinina bencil amino purina. Los estudios futuros son encaminados para inducir la formación de raíces.

Agradecimientos

AMMS agradece a la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Colombia por las facilidades de Movilidad al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos; asimismo, a las maestras Sandra Luz Escobar y Antonia de Jesús Sánchez, por su apoyo y asesoría. SEL, GSJ y MRM son becarios de los sistemas institucionales EDI y COFAA del IPN.

Literatura citada

- Arya, S. and Kalia, R. 2000. Induction embryogenesis in *Pinus roxburghii* sarg. Plant Cell Reports. 19:775-780.
- Barrero, A.; Quilez, J.; Herrador, M.; Arteaga, J; Akssira, M.; Benharref, A. and Dakir, M. 2005. Abietane diterpenes from the cones of *Cedrus atlantica*. Phytochemistry. 66:105-111.
- Cantillo, R.; Igarza, J. y Ochoa, A. 2011. Propagación *in vitro* de plantas de *Pinus cubensis griseb.* Biotecnol. Vegetal. 11:3-13.
- Chebli, B.; Achouri, M.; Hassani, I. and Hmamouchi, P. 2003. Antifungal activity of essential oils from several medicinal plants against four postharvest citrus pathogens. Phytopathol. Mediterranean. 42:251-256.

stage often represents the critical and difficult phase in micropropagation protocols of most woody species. In this regard Paz *et al.* (2009) reported that in *P. maximartinezii*, only 3% succeeded in inducing root formation in shoots with IBA concentration of 3 mg L⁻¹. An alternative to improve the rooting process of *C. atlantica* seedlings could be the use of IBA in combination with NAA. This considering the results reported for *Pinus cubensis* (Oliveira *et al.*, 2011) who report that the combination of 1.8 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid (NAA) and 2.03 mg L⁻¹ IBA promotes the formation of 47% of roots, without callus formation.

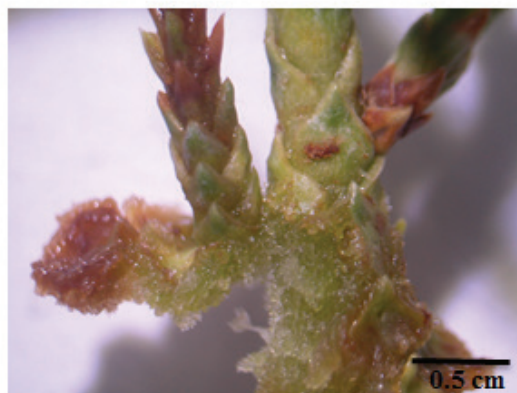


Figura 3. Formación de callos explantes de *Cedrus atlantica* en presencia de ácido indolbutírico.

Figure 3. Formation of callus explants of *Cedrus atlantica* in presence of indole butyric acid.

Conclusion

This study reports a protocol to obtain *in vitro* culture of *C. atlantica* from axillary buds. The culture medium used is WPM with addition of activated carbon and cysteine with which an *in vitro* culture is obtained without oxidation features and with potential for the generation of outbreaks in the presence of benzyl amino purine. Future studies are designed to induce root formation.

End of the English version



- Evans, D. E.; Coleman, J. O. D. and Kearns, A. 2003. Plant cell culture. Bios Scientific Publisher. New York, USA. 19-29 pp.
- Hammer, K.; Carson, C. and Rile, Y. T. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86:985-990.
- Hartmann, H.; Kester, D.; Davies, and Geneve, R. 2002. Plant propagation: principles and practices. Prentice Hall. 7th Ed. 880 p.

- López, A.; Olguín, L.; Márquez, J.; Chávez, V. and Bye, R. 2000. Adventitious bud formation from mature embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endangered Mexican spruce tree. *Ann. Bot.* 86:921-927.
- Mccown, B. and Lloyd, G. 1981. Woody plant medium (WPM) a revised mineral formulation for micro-culture of woody plant species. *HortSci.* 16:453.
- Murashige, T. and Skoog, E. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum.* 15:473-497.
- Oliveira, L.; Lopes, P.; Quoirin, M.; Soares, H.; Amano, E. and Rioyei, A. Micropropagation of *Pinus taeda* L. from juvenile material. 2011. *Tree Forestry Sci. Biotechnol.* 1:96-101.
- Orellana, P. 1998. Introducción a la propagación masiva. *In: propagación y mejora genética de plantas por biotecnología.* Instituto de Biotecnología de Plantas, Santa Clara. Cuba. Pérez-Ponce J. Ed. 125-133 pp.
- Pijut, P. 2000. Cedrus- the true cedars. *J. Arboric.* 26:4.
- Schenk, R. and Hildebrandt, A. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian J. Bot.* 50:199-204.
- Rebolledo, V.; Aparicio, A. y Cruz, H. 2006. Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. *Foresta Veracruzana.* 8:27-32.
- Robledo, A.; Villalobos, V. y Santacruz, A. 2009. Inducción eficiente de brotes adventicios en cotiledones de *Pinus maximartinezii* Rzedowski. 2009. *Acta Bot. Mex.* 89:47-62.
- Tamta, S. and Palni, L. 2004. Studies on *in vitro* propagation of Himalayan cedar (*Cedrus deodara*) using zygotic embryos and stem segments. *Indian J. Biotechnol.* 3:209-215.
- Zacarias, M.; Luna, H.; Morales, L.; Verde, M.; Torres, T.; Pereyra, B.; Iracheta, L.; Saézn, E.; Salazar, R. y Cárdenas, E. 2006. Multiplicación *in vitro* del piñón azul *Pinus maximartinezii* (Rzedowski). *Inter. Bot. Exp.* 75:109-113.