

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Producción Agrícola y Animal

Licenciatura en Agronomía

Informe Final de Servicio Social

**Rescate de embriones *crío* preservados de Cedro Rojo (*Cedrela odorata*
L.)**

Prestador de Servicio Social

Fernández Cruz Lizbet

Matrícula

2153061611

Asesores:

M.C. Dorys Primavera Orea Coria

No. Económico 16435

Dr. Carlos Román Castillo Martínez

No. Cédula profesional 2162857

**Lugar de Realización: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
Av. Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina, Delegación Coyoacán, CP. 04010.**

Fecha de inicio y terminación: 14 de enero al 15 de Julio del 2020.

I.	RESUMEN.....	3
II.	INTRODUCCIÓN.....	3
III.	JUSTIFICACIÓN.....	5
IV.	MARCO TEÓRICO.....	5
	4.1 Cedro rojo.....	5
	4.2 Descripción.....	6
	4.3 Distribución Geográfica.....	6
	4.4 Usos.....	7
	4.5 Crío preservación.....	7
	4.6 Conservación <i>in-vitro</i>	8
	4.6.1 Medios de cultivo para la propagación <i>in-vitro</i>	8
	4.6.2 Medio de cultivo Murashige y Skoog.....	9
	4.7 Crecimiento mínimo.....	9
V.	OBJETIVOS.....	10
	5.1 Objetivo General.....	10
	5.2 Objetivos Específicos.....	10
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
	7.1 Sitio de estudio.....	10
	7.2 Material vegetal.....	10
	7.3 Diseño experimental y Tratamientos.....	10
	7.4 Deshidratación de semillas al 5%.....	11
	7.5 Inmersión en nitrógeno líquido.....	11
	7.6 Descongelamiento rápido (choque térmico).....	12
	6.7 Obtención de embriones.....	12
	7.8 Evaluación de Germinación.....	13
	7.9 Aclimatación.....	13
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
	8.1 Análisis de Resultados.....	14
	8.2 Discusión.....	17
IX.	CONCLUSIONES.....	18
X.	RECOMENDACIONES.....	18
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	18

I. RESUMEN

El cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) es una especie en peligro de extinción. Por ello, es necesario desarrollar estrategias para la conservación *ex-situ* con el fin de perpetuar la especie, y germoplasma, además de la variabilidad genética. Para las investigaciones sobre esta especie del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, en este servicio social se apoyó en la generación de un protocolo para el rescate de embriones *crío* preservados. En primera instancia, se establecieron distintos tratamientos para la crioconservación los cuales consideraban deshidratación y descongelamiento rápido y lento de las semillas antes de obtener los embriones para sembrar *in vitro*. El tratamiento 3 arrojó el mayor porcentaje de individuos recuperados con el 36% al cabo de los 30 días de evaluación, en ninguno de los casos se utilizó la deshidratación de las semillas, pero sí el descongelamiento rápido para el tratamiento 3 que fue el sometido a Nitrógeno Líquido. Se lograron establecer 40 individuos resultantes de los tratamientos 1 y 3 a la fase de aclimatación, sin embargo, solo se obtuvo el 35% de plántulas totalmente aclimatadas al cabo de 30 días. La valuación fue obtenida por datos cualitativos por lo cual se sugiere el mejorar el control del medioambiente en el cual se desarrollaron las plántulas en esta fase.

II. INTRODUCCIÓN

El Cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) es una especie de la familia Meliaceae con origen en la América tropical. Se distribuye por Centroamérica e islas del Caribe, hasta Brasil; en climas tropicales y subtropicales, húmedos y semihúmedos; se le puede ubicar desde localidades al nivel del mar en varios países hasta cerca de los 3000 msnm en Bolivia, en el caso del territorio mexicano, abarca tanto la vertiente del golfo, desde el sur de Tamaulipas y sureste de San Luis Potosí hasta la península de Yucatán, así mismo la del Pacífico, desde Sinaloa hasta Guerrero y en la depresión central y la costa de Chiapas (Patiño, 1997 citado por Romo, *et al.*, 2017).

Históricamente en México, el cedro rojo ha sido una especie de alto valor económico, aprovechada y propagada por el hombre; su utilidad ha sido variable, desde uso artesanal [madera y frutos], elaboración de implementos agrícolas [madera], medicinal [hojas, raíz, corteza, semilla, tallo y exudado], melífera [flores], ornato [el árbol en parques y áreas verdes] (Jiménez *et al.*, 2018).

El alto valor comercial ha provocado su disminución en ambientes naturales. Con base a la NOM-059-SEMARNAT-2010, la especie es considerada en peligro de extinción, además, vulnerable en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (Denisse 2010; IUCN, 2011 citado por Hernández, 2019), debido a la acelerada deforestación de los bosques naturales y la extracción intensiva de madera, en el país y de forma general en Mesoamérica, durante más de 200 años (Wadsworth, 2000).

La conservación de germoplasma de *C. odorata*, así como la propagación del mismo podría contribuir a la subsistencia de la especie en la naturaleza. Hoy día se desarrollan opciones de conservación de germoplasma y subsistencia de acervos genéticos a especies con alto valor económico y alimenticio donde se emplean métodos de preservación *in-situ* y *ex-situ* (Fernández *et al.*, 2018).

El método *in-vitro* constituye una estrategia *ex-situ* de conservación e intercambio de recursos fitogenéticos de plantas cultivadas de corta y poca viabilidad que requieren ser propagadas vegetativamente, mismas que conservan la mayor diversidad genética posible de una población (Engelmann, 1997), del cual se derivan el método de crecimiento mínimo y la *crío* preservación. El primero se basa en modificar las condiciones óptimas de una especie para disminuir la velocidad de crecimiento y la *crío* conservación (Fernández *et al.*, 2018) y el segundo consiste en el almacenamiento de células vivas y organismos a bajas temperaturas -196 °C en nitrógeno líquido (NL) (Engelmann, 2011).

En esta investigación se tuvo como propósito implementar y generar un protocolo para el rescate de embriones previamente *crío* preservados de *C. odorata*, tomado y modificado de Hernández, (2019).

III. JUSTIFICACIÓN

El cedro rojo (*C. odorata*) es una especie en peligro de extinción. Por ello, es necesario desarrollar estrategias para la conservación *ex-situ* con el fin de perpetuar la especie, y germoplasma, además de la variabilidad genética.

En ese sentido, la conservación *in-vitro* de germoplasma vegetal, ofrece la posibilidad de almacenar elevado número y variedad de muestras en áreas reducidas, además, facilita la evaluación y genera condiciones asépticas que garantizan mayor sanidad de las muestras, en consecuencia permite incrementar el intercambio de materiales vegetales sanos, así mismo el desarrollar protocolos de *crío* preservación evita alteraciones fisiológicas durante la conservación por lo que en este trabajo se implementará una estrategia de crecimiento *in-vitro* con la intención de proveer un medio seguro donde conservar accesiones de la especie y obtener plántulas completas y disponibles para la propagación en campo.

IV. MARCO TEÓRICO

El Cedro rojo es una especie forestal característica de las regiones tropicales perteneciente a la familia Meliaceae, es una de las especies de mayor valor económico ya que se le considera una madera preciosa, debido a esto, ha sido severamente afectada por la deforestación, al fragmentar y disminuir sus poblaciones naturales (Sánchez *et al.*, 2003 citado por Velázquez, 2010).

4.1 Cedro rojo

De acuerdo a Cronquist, (1981), citado por Juárez, (2013), el cedro rojo se clasifica de la siguiente manera:

- División: Magnoliophyta
 - Clase: Magnoliopsidae
 - Subclase: Rosidae
 - Orden: Sapindale

- Familia: Meliaceae
- Género: *Cedrela*
- Especie: *Cedrela odorata* L.

4.2 Descripción

El cedro rojo es un árbol caducifolio, de 20 hasta 45 m de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 1.7 m. Se han encontrado individuos de más 60 m de altura. Copa grande, redondeada, robusta y extendida o copa achatada. Hojas alternas, paripinnadas o imparipinnadas, de 15 a 50 cm, incluyendo el pecíolo, compuestas por 10 a 22 folíolos opuestos o alternos, de 4.5 a 14 cm de largo por 2 a 4.5 cm de ancho, lanceolados u oblongos (CONABIO, 2013), flores masculinas y femeninas en la misma inflorescencia, colocadas en panículas terminales o axilares de 25 a 35 cm de largo (CONAFOR, 2009), frutos en cápsula leñosa redondeada dehiscente en ambos extremos, se abren en el árbol cuando están maduros y liberan las semillas. Por eso, deben recolectarse del árbol cuando cambian de color verde a marrón, justo antes de que se abran (INAB, 2017), sexualidad monoica (CONABIO, 2013).

4.3 Distribución Geográfica

Se le encuentra distribuido de manera natural desde el norte de México hasta Bolivia y el norte de Argentina, así como en las islas del Caribe. Debido a su amplia distribución en América tropical forma parte de la flora nativa de la mayoría de los países latinoamericanos, a excepción de Chile (INAB, 2017), en México, como se muestra en la Figura 1, se localizan en la vertiente del Golfo desde el sur de Tamaulipas, sureste de San Luis Potosí y las Huastecas hasta el norte de Chiapas, la selva Lacandona, la depresión central de Chiapas y la península de Yucatán, y en el Pacífico desde Sinaloa hasta Jalisco, Colima y en la costa de Chiapas (Juárez, 2013). De un total de 93,000 has los estados con mayor superficie plantada de cedro rojo son: Veracruz 24.8%, Campeche 18.42%, Oaxaca 12.28%, Chiapas 11.10%, Puebla 9.13%, Tabasco 4.78%, Yucatán 4.09% y el resto de los estados mencionados 15.4% (FUMIAF y SAGARPA, 2005 citado por Apolinar, 2011).



Figura 1. Distribución de *Cedrela odorata* L. en México (Pennington y Sarukhán, 2005).

4.4 Usos

El cedro rojo es una de las especies tropicales preciosas, ya que produce una madera de muy alta calidad, fácil de trabajar, no presenta problemas en los procesos de secado, posee buena estabilidad y durabilidad (Cintron, 1990; Méndez y Sánchez, 2012). Su madera empleada en la elaboración de muebles finos, trabajos de gabinetes, canoas, pisos, puertas, marcos de ventanas, cajas para puros y en la fabricación de instrumentos musicales. Con los frutos se hacen arreglos artesanales, principalmente flores (SIRE, 2012).

4.5 Crío preservación

La *crío* preservación es una de las técnicas más promisorias para la conservación de germoplasma vegetal. Consiste en llevar el tejido a un estado de cero metabolismos, sometiéndose a las temperaturas del nitrógeno en fase líquida o de vapor. Se inhibe la división celular y la mayoría de los procesos metabólicos y físicos (Ramírez y Salcedo, 2013), por lo que el material puede permanecer almacenado por tiempo indefinido sin que sufra modificaciones fisiológicas.

La *crío* preservación es especialmente recomendada para conservar los recursos fitogenéticos de especies recalcitrantes, sensibles a la desecación, cuyo potencial para ser conservadas se ve limitado al utilizar otras modalidades (Martínez *et al.*,

2003); así como en especies en peligro de extinción que debido a su escasez o por algún factor particular de su biología, se encuentran gravemente amenazadas de desaparecer (Abdelnour *et al.*, 1992). Posterior a esto, puede utilizarse una técnica *in-vitro* para los explantes resultantes de *crío* preservación. Es una nueva alternativa que permite almacenar bajo condiciones de alta estabilidad estos importantes recursos (García *et al.*, 2007).

Existen dos tipos principales de procedimientos de *crío* preservación: la congelación lenta convencional, basada en la deshidratación inducida por la congelación, y, la congelación ultrarrápida o vitrificación, implica la deshidratación previa a la refrigeración (Engelmann, 2011).

4.6 Conservación *in-vitro*

Una de las técnicas de mayor innovación en la agricultura es el cultivo *in-vitro* de tejidos vegetales, método que se enfoca en la conservación de la diversidad genética de plantas cultivadas, permitiendo la multiplicación de especies en peligro de extinción o de poblaciones extremadamente pequeñas o con limitaciones para su reproducción (Bohórquez- Quintero *et al.*, 2016).

La conservación *in-vitro* se fundamenta en dos métodos: "El crecimiento mínimo lo cual se basa en modificar las condiciones óptimas de cultivo, para disminuir la velocidad de crecimiento normal de la especie de estudio, sin embargo, la *crío* conservación implica la inmersión directa de los explantes en nitrógeno líquido a -196°C ya que detienen todos los procesos metabólicos y la división celular" (Iriondo, 2001) y evita que el agua dentro de los tejidos se cristalice.

4.6.1 Medios de cultivo para la propagación *in-vitro*

Las conservaciones *in situ* y *ex situ* se consideran bancos genéticos para preservar especies de plantas con semillas ortodoxas de climas templados y subtropicales. Sin embargo, métodos de conservación de especies sin semillas y las que presentan semillas recalcitrantes siguen siendo limitados. Por lo que *in-vitro* o preservación de tejido vivo, es la manera de conservación más empleada para estas especies (Cha-um y Kirdmanee, 2007).

El cultivo *in-vitro* se realiza en medios artificiales, que proporcionan los nutrientes necesarios para el desarrollo de la especie de interés influenciado principalmente por la naturaleza del medio utilizado y otros factores ambientales que se tomen en cuenta para el desarrollo de este. Estos están constituidos por componentes inorgánicos, los cuales son suministrados en cantidades relativamente grandes de macronutrientes y otros añadidos en menor cantidad micronutrientes (EcuRed, 2018).

4.6.2 Medio de cultivo Murashige y Skoog

El medio MS, (Murashige y Skoog, 1962), es utilizado muy a menudo, particularmente si el objetivo es regenerar el tejido vegetal; existen numerosas variaciones comerciales de este medio (Blanco, 2008).

Tomando como base las sales minerales, vitaminas y fuente de carbono se pueden realizar variados medios de cultivo donde los reguladores de crecimiento y concentración dependen estrictamente de las necesidades requeridas (Blanco, 2008).

4.7 Crecimiento mínimo

El método de crecimiento mínimo ha sido ampliamente utilizado en la práctica para la conservación de germoplasma, existen varios ejemplos de su aplicación en la creación de bancos *in-vitro* y constituye una de las principales variantes para garantizar el éxito de un programa de conservación, debido a la relativa sencillez y puede ser establecido con facilidad con el equipamiento que normalmente existe en un laboratorio de cultivo de tejidos, se basa en la disminución de la división celular y el metabolismo de la planta. Tiene como objetivos incrementar la longevidad *in-vitro* de los cultivos sin producir cambios genéticos, por tanto, no hay una detención total de los procesos celulares sino una disminución en la velocidad de los mismos y así se reduce la frecuencia de transferencia de las plantas a medio de cultivo fresco (Roca *et al.*, 1994 citado por García *et al.*, 2007).

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Generar un protocolo para el rescate y la preservación de embriones *crío* preservados de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.).

5.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la respuesta de descongelación rápida y lenta en embriones *crío* preservados de cedro rojo.
- Generar plántulas completas de *C. odorata* recuperadas de *crío* preservación.
- Evaluar la aclimatación de plántulas recuperadas de *crío* preservación.

VI. METAS

- Recuperar al menos el 60% del material *crío* preservado.
- Aclimatar plántulas obtenidas del mejor tratamiento.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Sitio de estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del CENID–COMEF del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), bajo la dirección del Dr. Carlos Román Castillo. Ubicado en: Av. Progreso #5, Colonia Barrio de Santa Catarina, Delegación Coyoacán. CDMX. CP. 04010.

7.2 Material vegetal

El germoplasma (semillas) de cedro rojo que se utilizó para los ensayos de la presente investigación corresponden a un lote mezcla, conformado con diferentes genotipos procedentes de Chiapas, Veracruz y Tabasco.

7.3 Diseño experimental y Tratamientos

Con el fin de evaluar la respuesta de descongelación rápida y lenta de los embriones *crío* preservados en nitrógeno líquido, fueron sometidos a los distintos tratamientos explicados en el Cuadro 1. Consistió de un diseño completamente al

azar, la unidad experimental será un lote de 20 semillas con 5 repeticiones cada uno.

Cuadro 1. Diseño experimental y determinación de tratamientos

Tratamiento y acondicionamiento	Descongelación (choque térmico)	Germinación	Repeticiones	Total, de semillas por tratamiento
Tratamiento 1 (testigo)	-	<i>In vitro</i>	5 de 20 semillas cada uno	100
Tratamiento 2 (deshidratación al 5%)	Rápida			100
Tratamiento 3 (tal cual se obtiene del lote)	Rápida			100
Tratamiento 4 (deshidratación al 5%)	Lenta			100
Tratamiento 5 (tal cual se obtiene del lote)	Lenta			100
TOTAL				500

7.4 Deshidratación de semillas al 5%

La deshidratación se llevó a cabo mediante la exposición de las semillas al compuesto sílica gel. En primera instancia, se activó la sílica gel en microondas esperando el cambio de color del mismo, posteriormente, se prosiguió a colocar los tratamientos y sus respectivas repeticiones sobre dicho compuesto y fueron llevados al desecador por 3 horas.

7.5 Inmersión en nitrógeno líquido

Los tratamientos y sus respectivas repeticiones fueron colocados en papel aluminio detallando y separando cuidadosamente cada uno de ellos para evitar cambio de semillas, a su vez, se colocaron dentro de una malla como se muestra en la Figura 2 para así ser sumergidas directamente en nitrógeno líquido por 30 minutos.



Figura 2. Acondicionamiento de semillas para inmersión en nitrógeno líquido.

7.6 Descongelamiento rápido (choque térmico)

Transcurridos los 30 min de la exposición de las semillas al nitrógeno líquido, los tratamientos seleccionados fueron sometidos a un choque térmico el cual consistió en sumergirlos en agua destilada (Figura 3) a una temperatura de 30°C durante 5 min manteniendo esa misma temperatura constante como se observa en la Figura 4.



Figura 3. Choque térmico de semillas.



Figura 4. Verificación de temperatura a 30°C con ayuda de termómetro.

6.7 Obtención de embriones

Los tratamientos (excepto el tratamiento 1) fueron colocados en peróxido y puestos al agitador por 24 horas con el fin de suavizar la testa, posteriormente pasaron por un tren de desinfección el cual consistió en exponerse a alcohol al 70% y cloro al 30% por 15 y 10 minutos respectivamente siendo enjuagadas con agua estéril entre reactivos (Figura 5).

Con ayuda de cajas Petri, bisturí y pinzas se realizó la obtención del embrión de la semilla el cual consistió en retirar la testa cuidadosamente manteniendo la plúmula y los cotiledones (Figuras 6 y 7) para así conservar intacto el embrión.

Posteriormente, cada uno de los tratamientos fue sembrado en tubos de ensayo con medio MS.



Figura 5. Semillas previamente desinfectadas.



Figura 6. Manipulación de semillas y retiro de testa.



Figura 7. Obtención de embriones.

7.8 Evaluación de Germinación

El método de evaluación para la germinación de los embriones *crío* preservados es en conformidad a los reglamentos establecidos por el International Seed Testing Association (ISTA, 2011).

1. Germinación *sensu stricto* (aproximadamente 2 mm de radícula).
2. Germinación/emergencia (aproximadamente 1 cm radícula).
3. Crecimiento de epicótilo.
4. Tiempo en aparecer primera hoja verdadera.
5. Evaluación en intervalo de 15 días de sobrevivencia de la plántula.

Con esto se valoró el efecto del nitrógeno líquido en la recuperación y germinación de embriones de *C. odorata*.

7.9 Aclimatación

Se tomaron las plántulas completas obtenidas de *crío* y, con ayuda de las pinzas, se retiraron cuidadosamente del medio MS para ser puestas en caja Petri con agua tibia y así poder retirar el exceso de medio en raíces. De igual manera, se sumergieron en Captan con el fin de evitar contaminación.

Una vez extraídas pasaron a sembrarse en vasos de unicel con sustrato previamente esterilizado y tapados con vasos transparentes para, de alguna manera, simular las condiciones que mantenían cuando estaban *in vitro*.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Análisis de Resultados

El procesamiento de los datos consistió de un diseño completamente al azar con 100 repeticiones por tratamiento y se llevó a cabo mediante un análisis de varianza y prueba de significación Tukey con un nivel de confianza de 0,05 esto mediante el programa de análisis estadístico SAS® Studio <https://welcome.oda.sas.com/>

Considerando características cualitativas como color y desarrollo de raíces, así como la aparición de hojas verdaderas el tratamiento T3 arrojaba mejor resultado comparándose con los demás tratamientos en el mismo lapso de tiempo (a 10 días) Figuras 8 y 9.

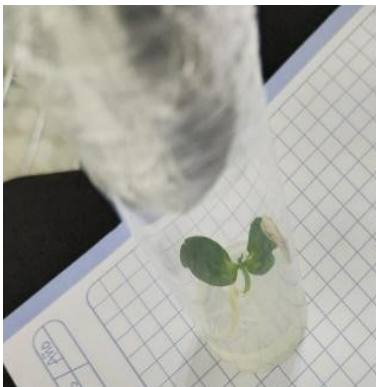


Figura 8. Plántula correspondiente al T3. **Figura 9.** Plántula correspondiente al T1.

La *crío* preservación redujo en un grado mínimo la recuperación a comparación de las semillas no expuestas como se puede apreciar en dichas imágenes.

Sin embargo, es preciso decir que si existen diferencias significativas entre tratamientos al finalizar el periodo de evaluación de 30 días. Los límites de confianza de las proporciones esperadas confirman este hecho (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados de prueba T

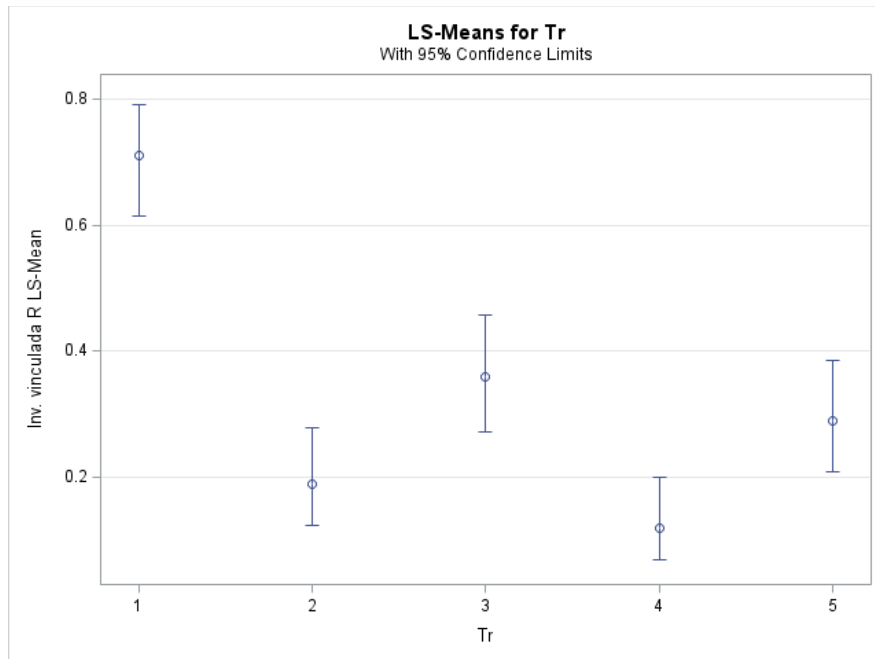
Test de tipo III de efectos fijos				
Efecto	DF Num	DF Den	Valor F	Pr > F
Tr	4	495	19.84	<.0001

TrMedias de mínimos cuadrados												
Tr	Estimación	Error estándar	DF	t valor	Pr > t	Alfa	Inferior	Superior	Media	Media del error estándar	Media inferior	Media superior
1	0.8954	0.2204	495	4.06	<.0001	0.05	0.4624	1.3284	0.7100	0.04538	0.6136	0.7906
2	-1.4500	0.2549	495	-5.69	<.0001	0.05	-1.9508	-0.9492	0.1900	0.03923	0.1245	0.2791
3	-0.5754	0.2083	495	-2.76	0.0060	0.05	-0.9847	-0.1660	0.3600	0.04800	0.2720	0.4586
4	-1.9924	0.3077	495	-6.47	<.0001	0.05	-2.5970	-1.3878	0.1200	0.03250	0.06933	0.1998
5	-0.8954	0.2204	495	-4.06	<.0001	0.05	-1.3284	-0.4624	0.2900	0.04538	0.2094	0.3864

Como se muestra en el cuadro, nuestra T obtenida <.0001 nos indica que sí hay diferencias entre nuestros tratamientos.

En el Gráfico 1 puede observarse claramente que si bien, el tratamiento 1 (testigo) expresó la mayor cantidad de recuperación el tratamiento 3 fue el que obtuvo el mayor porcentaje de recuperación con un 36% seguidos por los tratamientos 5, 2 y 4 con el 29%, 19% y 12% respectivamente. Cabe recalcar que, como se ha mencionado anteriormente, el periodo de evaluación fue de 30 días solamente.

Gráfico 1. Representación de variabilidad de los tratamientos.

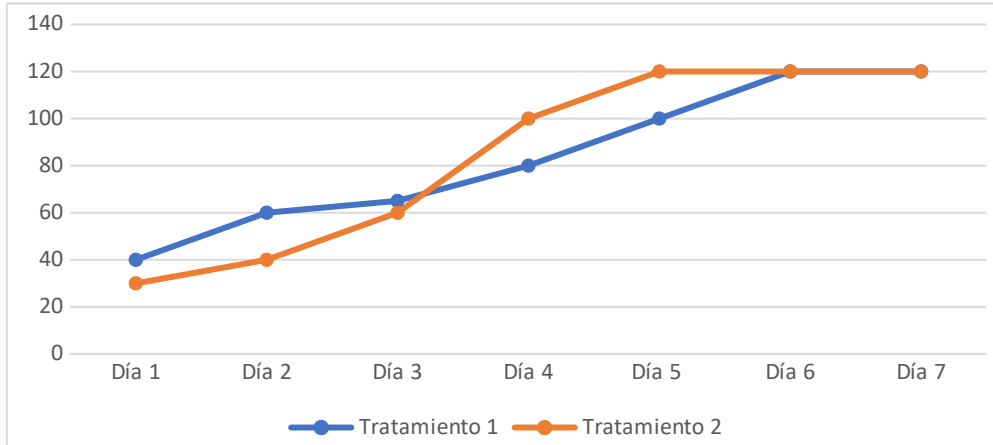


Considerando los resultados anteriores, se tomaron los mejores tratamientos (1 y 3) para la fase de aclimatación, se consideraron las plántulas que se mostraban más vigorosas y que su altura topaba con el tubo donde se encontraban establecidas obteniendo 20 plántulas por tratamiento (Figura 10). En primera instancia, éstas fueron sometidas a una especie de estrés la cual consistió en retirar la cubierta (que les fue colocada al ser trasplantadas a sustrato) manteniéndolas en observación constante, midiendo el tiempo de resistencia (minutos) antes de que mostraran oxidación o marchitamiento observado en el Gráfico 2.



Figura 10. Trasplante para aclimatación.

Gráfico 2. Tiempo de adaptabilidad de plántulas trasplantadas.



Se puede observar que las plántulas lograron permanecer expuestas a las condiciones medioambientales sin sufrir daños al cabo de una semana, posteriormente, se evaluó la supervivencia de los individuos por 30 días para considerar una completa aclimatación Figura 11.



Figura 11. Total, de individuos al término de aclimatación.

A final del periodo de aclimatación, solamente el 35% de las plántulas lograron sobrevivir.

8.2 Discusión

En los distintos tratamientos utilizados en el presente trabajo, se puede observar que la deshidratación marca una diferencia significativa en la metodología de la preservación de embriones pues sin necesidad de exponerse se obtiene grandes resultados y facilita el proceso, sin embargo, debe prestarse mayor atención a la

metodología utilizada en la obtención de embriones puesto que resulta ser un tanto ruda la manipulación de las semillas y podría inferirse un daño microscópico al embrión, esto considerando el estudio realizado por García y Abdeldnour (2013) quienes obtuvieron gran respuesta de germinación de *crío* conservación manejando semillas de cedro rojo en todo momento.

En cuanto la recuperación algunas de las principales causas de la pérdida de individuos fue la contaminación, exceso de riego (humedad) y el control de las condiciones ambientales como temperatura y exposición a la luz, como lo menciona Agramonte et al. (1998) el control de la intensidad de la luz en esta fase es importante ya que las plantas provienen de un ambiente con intensidad baja, por lo tanto, ésta se debe regular para evitar la fotoinhibición del aparato fotosintético.

IX. CONCLUSIONES

- Se logró generar un protocolo para el rescate y la preservación de embriones *crío* preservados de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.).
- La descongelación rápida muestra mayor obtención de embriones *crío* preservados germinados.
- El cultivo *in vitro* es altamente recomendado para *crío* preservación.
- Se logró obtener plántulas completas de *C. odorata* recuperadas de *crío* preservación.

X. RECOMENDACIONES

- Mejorar la técnica de obtención de embriones para conseguir mayor porcentaje de recuperación de material *crío* preservado.
- Generar una metodología de aclimatación para plántulas obtenidas *in vitro*.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abdeldnour, E. A.; Villalobos, V. y Engelmann, F. (1992). Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea spp.* *Cryo-Letters*, 13, 297-302.

Agramonte, D.; F. Jiménez M. A. y Dita A. (1998) Aclimatización en Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Editorial Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. 400 pp.

Apolinar, H. M. M. (2011). Generación de un vector para la transformación genética de cloroplastos en cedro rojo (*Cedrela odorata* L.). Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México. 120 pp.

Blanco, B. A. (2008). Preparación de Medios de Cultivo. Escuela de Recursos Naturales Ingeniería (E) Agronomía Fisiología Agrícola. DUOC UC. [en línea]. [Fecha de consulta: 21 de enero de 2020]. Disponible en: <https://fisiohorticola.files.wordpress.com/2008/11/laboratorio-medios-de-cultivo.doc>

Bohórquez-Quintero, María A; Araque-Barrera, Eyda J; Pacheco-Maldonado, José C. (2016). Actualidades Biológicas; Medellín Tomo 38, N.º 103, 23-36 p.

Cha-um, S. y Kirdmanee, C. (2007). Minimal Growth *in vitro* Culture for Preservation of Plant Species. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 1(1), 13-25.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2013). Re: *Cedrela odorata*. [en línea]. [Fecha de consulta: 31 de enero de 2020]. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/36-melia2m.pdf.

Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). (2009). Cedro (*Cedrela odorata* L.) Protocolo para su colecta, beneficio y almacenaje. Yucatán, México. [en línea]. [Fecha de consulta: 07 de febrero de 2020]. Disponible en: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/19/1299Cedro%20rojo%20Yucatán.pdf>

EcuRed. (2018). Conservación *in vitro* de Recursos Genéticos Vegetales. Cuba. [en línea]. [Fecha de consulta: 07 de febrero de 2020]. Disponible en: https://www.ecured.cu/Conservación_in_vitro_de_Recursos_Genéticos_Vegetales

Engelmann, F. (1997). *In vitro* conservation methods. Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use 119–162. Ford-Lloyd B. V. Newbury J. H. Callow J. A. Wallingford. CABI.

Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(1), 5-16.

Fernández, C. L.; García, F. A.; Olvera, P. D. L. y Ramírez, P. L. (2018). Conservación *in vitro* de recursos genéticos de *Solanum tuberosum* L. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. CDMX.

García-Águila, L.; de Fera, M. y Acosta, K. (2007). Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal*, 7(2).

García, R. T. y Abdelnour, E. A. (2013). *Agronomía Costarricense* 37(1): 113-126. ISSN:0377-9424 / 2013

Hernández, D. G. A. (2019). Protocolo para *crío* preservar germoplasma de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.). Tesis de pregrado. Instituto Tecnológico Superior de la Sierra Norte de Puebla. Heróica Ciudad de Zacatlán, Puebla. 51 pp.

Instituto Nacional de Bosques (INAB). (2017). Cedro *Cedrela odorata*; paquete tecnológico forestal. Guatemala, INAB. 55 pp. [en línea]. [Fecha de consulta: 29 de enero de 2020]. Disponible en: https://www.itto.int/files/itto_project_db_input/2802/Technical/CEDROD.pdf

Iriondo Alegría, J. M. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg (ES)*, 16(1), 5-24.

International Seed Testing Association (ISTA). (2011). International rules for seed testing. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Brasserdorf, Switzerland.

Jiménez, R. C. A.; de los Santos, P. H. M.; Parraguirre, L. J. F. y Saavedra, M. F. D. (2018). Evaluación de la categoría de riesgo de extinción de cedro rojo (*Cedrela odorata*) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 89 (11): 938 – 949.

Juárez, G. J. (2013). Rejuvenecimiento de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.), mediante micro injertación e injertación. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Mérida, Yucatán, México. 65 pp.

Martínez, R., Azpiroz, H., Rodríguez, J., Cetina, M., Gutiérrez, M. (2003). Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales de Ambiente, 9:3-5.

Méndez-Espinoza, C., V. Sánchez M. (2012). Descriptores morfológicos de *Cedrela odorata* L. para México. Folleto Técnico Núm. 7. CENID-COMEF, INIFAP. México. 52.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.

Ramírez, M., & Salcedo, J. (2013). Los recursos fitogenéticos y la importancia estratégica de su conservación en las Américas en América Latina y el Caribe, 15.

Romo, L.; José, L.; Vargas, H. J. J.; López, U. J. y Ávila, A. M. L. (2017). Estimación del valor financiero de las existencias maderables de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) en México. *Madera y Bosques*, 23(1),111-120. [en línea]. [Fecha de Consulta 9 de febrero de 2020]. ISSN: 1405-0471. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=617/61750015009>

Sistema Integral de Resultados de las Evaluaciones (SIRE). (2012). *Cedrela odorata*. Paquetes Tecnológicos. [en línea]. [Fecha de consulta: 09 de febrero de 2020]. Disponible en: [http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/898Cedrela%20odorata, pdf.](http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/898Cedrela%20odorata.pdf)

Velázquez, M. A. (2010). Situación actual y perspectivas de las plantaciones forestales comerciales en México. Boletín de la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR).

Wadsworth, F. H. (2000). Producción forestal para América Tropical, Departamento de Agricultura de los EE. UU, Servicio Forestal, Manual de Agricultura, 603.