

# Estudios conducentes al establecimiento *in vitro* de *Prumnopitys standleyi* (ciprecillo), especie forestal nativa de Costa Rica

Estudiante Investigador: José Pablo Gamboa Zúñiga  
Escuela de Ingeniería Forestal

## Resumen

*Este proyecto investigó nuevas formas de propagar una especie forestal, nativa de Costa Rica, que está en peligro de extinción y tiene un alto potencial económico. Nuevas técnicas biotecnológicas, como la reproducción "in vitro", se están proyectando como la revolución del mañana, por lo tanto, se trató de implementar estas herramientas modernas al campo forestal. Los resultados que se obtuvieron de la investigación fueron positivos, además, han generado grandes expectativas en el campo forestal y aunque todavía falta más investigación, ya se puede visualizar la posibilidad de adaptar las técnicas de cultivo "in vitro" en la silvicultura clonal de los árboles tropicales.*

## Abstract

*This research project studied new methods for the propagation of a native forestry species in danger of extinction and high economical potential. New biotechnological techniques, as "in vitro" reproduction, are already taking place as the future technological revolution. As a result, to implement these modern tools on forestry field. The results obtained an attempt showed positive response and was done generated high expectatives in forestry field and although further investigation are needed; we can already consider the probability to adopt the "in vitro" techniques in clonal silviculture in tropical trees.*

## Descripción general del problema

Especie: *Prumnopitys standleyi* (Buchholz & Gray) de Laubenfels

Familia: Podocarpaceae.

Nombre vulgar: ciprecillo, ciprés lorito.

En Costa Rica se encuentra en alturas de 1400-2700 metros sobre el nivel del mar, en las montañas de Poás, San Ramón, Prusia, Carretera Interamericana Sur, Dota y reserva forestal Río Macho (Arnáez, S; Moreira, I. 1992). Fenológicamente no ha sido bien estudiada. El desarrollo de la semilla es lento, se requirieren hasta cinco meses para obtener semilla madura, sin embargo, la gran mayoría caen al suelo (tipo aborto) al tercer mes. Se ha observado que la especie no fructifica en períodos fijos. Debido a esta situación es que no se ha podido, hasta la fecha, lograr la obtención de semilla para establecer estudios detallados. Esta especie presenta gran potencial para convertirse en la conífera nacional que brindará la materia prima para la fabricación de papel (material celulósico de fibra larga) (Rojas, F; et al. 1993).

En forma natural regenera escasamente. Es una especie "rara" (en los bosque aparece con una frecuencia de 0,1 a 1 árbol por hectárea). Según Jimenez, Q. 1991, esta especie es muy escasa y sólo se ha reportado en las zonas altas de Costa Rica (especie endémica), por la que está considerada en peligro de extinción.

Tradicionalmente su madera se ha utilizado para carpintería, mueblería, artesanía, construcción de carretas, leña y carbón, postes de cercas, traviesas, armazones, chapas, cajonería, pisos y herramientas (Budowski. 1954 citado por Rojas, F; *et al.* 1993).

La razón para tratar de hallar nuevas formas de propagar esta especie masivamente. son el potencial económico que representa para la reforestación en las zonas altas de Costa Rica, los problemas en su reproducción y la posibilidad que a mediano o largo plazo el Ciprecillo desaparezca de nuestro hábitat natural.

### Objetivo general

- Evaluar el comportamiento bajo condiciones de cultivo *in vitro* del *Prumnopitys standleyi* (ciprecillo).

### Objetivos específicos

- Seleccionar el material idóneo para el establecimiento del proyecto.
- Evaluar varios métodos de desinfección del material.
- Desarrollar el protocolo para el establecimiento *in vitro* del material.
- Valorar el comportamiento de los materiales y los factores que influyen en su desarrollo *in vitro*.

## Estrategia metodológica

### Material vegetal

Debido a lo difícil que fue conseguir árboles accesibles para colectar los explantes, se utilizaron estacas y yemas laterales y apicales de un árbol ubicado en el kilómetro 71 de la carretera Interamericana Sur.

En el campo, los explantes se colectaron y envolvieron en papel toalla, se mojaron con agua destilada estéril y se metieron en una bolsa plástica para evitar su desecación. Las bolsas se colocaron en un recipiente con hielo, sellado para mantener frescos los explantes y luego se transportaron al laboratorio del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

### Etapas de desinfección

Inicialmente, los explantes se lavaron con agua y jabón enjuagándolos luego en un flujo continuo de agua. Posteriormente se colocaron en una solución de agrimicín más benlate a razón de 1,5 g / l (1:1) en agitación, por 90 minutos. Para la desinfección del material se aplicaron cinco tratamientos diferentes, resumidos en el cuadro 1.

Luego de la desinfección, los explantes se enjuagaron dos veces con agua destilada esteril y una vez con una solución de ácido cítrico y ácido ascórbico a razón de

**Cuadro 1**

*Tratamientos de desinfección en explantes de Prumnopitys standleyi Ciprecillo) realizados en el Laboratorio de Biotecnología del ITCR.*

#### No. Tratamientos

#### Compuestos

No. Tratamientos	Compuestos
1	MgCl <sub>2</sub> 0,5%* Ca(ClO) <sub>2</sub> bv 6% MgCl <sub>2</sub> 0,30 %* MgCl <sub>2</sub> 0,25%* Ca(ClO) <sub>2</sub> bv 10% Ca(ClO) <sub>2</sub> ct 4%* Ca(ClO) <sub>2</sub> ct 8%*
2	15 min. 4 min.
3	15 min.
4	15 min. 20 min.
5	10 min.

bv: bomba de vacío.

ct: cámara de transferencia de flujo laminar.

\*: en agitación

Ca(ClO)<sub>2</sub>: Cloruro de Calcio.

MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de mercurio

50 mg / l (1:1) para contrarrestar la oxidación del medio. En el tratamiento cinco hubo una variante en cuanto al lavado del material porque los explantes fueron sumergidos en Twen 20 por tres minutos en lugar de ser lavados con agua y jabón manualmente, luego se continuó con el proceso descrito.

### *Etapas de desarrollo de estructuras*

Para la etapa de inducción al desarrollo de estructuras se utilizaron dos tipos de medios: un medio Murashige y Skoog (MS) simple, diluida su concentración a la quinta parte según modificación de Carrizosa, 1984 citado por Calle, V; Torres, Y y Marín, A, 1996 y un segundo medio MS simple, diluida su concentración a la mitad.

Para cada medio se agregó: caseína hidrolizada a razón de 50 mg/l, 1 mg/l de glicina y 2,5 mg/l de vitaminas con una fuente de glucosa de 15 mg/l, y enriquecidos con un regulador de crecimiento de la siguiente forma (0, 2, 4, y 7 mg/l de Bencilaminopurina) cada uno con tres repeticiones y ocho unidades experimentales por tratamiento.

En esta etapa se trabajó sólo con yemas (laterales y/o apicales) en desarrollo. Una vez inoculados, los explantes se exponen por un período de 16 horas a luz roja para favorecer el rebrote (Buitargo, 1985 citado por Calle, V; Torres, Y; Marín, A, 1996).

La evaluación de esta etapa se hizo en términos de porcentaje de desarrollo de estructuras y se aplicaron un ANDEVA (Análisis de Varianza) y una prueba de medias para el análisis de los resultados, utilizando el programa estadístico Statistix 4.0.

### *Tipo de financiamiento*

El proyecto contó con el respaldo económico y académico de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

## *Resultados alcanzados*

Se concluyó que el material idóneo para el establecimiento *in vitro* de *Prumnopitys standleyi* (ciprecillo) son estacas de 2,0 cm de longitud aproximadamente y que presenten una yema lateral o apical en desarrollo.

Se bajó la contaminación a un 22,2 % con la inmersión de los explantes en twen 20 por tres minutos, enjuague en flujo continuo de agua + agrimicín y benlate a razón de 1,5 g/l (1:1) por 90 minutos en agitación + inmersión en cloruro de mercurio al 0,25 % por 10 minutos en agitación + dos enjuagues con agua destilada estéril y un enjuague más con una solución de ácido cítrico y ácido ascórbico a razón de 50 mg/l (1:1). Sin embargo, es recomendable aplicar este tratamiento de desinfección a explantes que sean colectados del campo en la época seca.

Se logró inducir al rebrote en promedio un 45 % de las yemas. La gran mayoría de los explantes comenzaron a presentar una necrosis de los tejidos a la quinta semana y posteriormente morían, pero unos cuantos lograron sobrevivir y desarrollarse.

La adición de bencilaminopurina (BAP) al medio de cultivo favorece la brotación y el desarrollo de yemas, al mismo tiempo se demostró que la reducción de sales minerales adicionadas (MS/2 y MS/5) no afectó el desarrollo de material ya que en ambos la brotación se comporta muy parecida.

### *Impactos*

No cabe duda que las nuevas tecnologías modificarán profundamente la inserción de América Latina en el mercado mundial, y la biotecnología (como nueva tecnología) se está proyectando como la revolución del mañana.

La biotecnología se ha desarrollado muy rápido durante los últimos años, y ha ganado gran importancia como herramienta biológica. Se puede visualizar un incremento en el uso del cultivo de tejidos en la propagación clonal de plantas, con una extensión significativa hacia los árboles forestales y frutales,

y hacia otros cultivos alimenticios (Villegas, L. 1988).

Es por ello que este proyecto evaluó el comportamiento bajo condiciones *in vitro* de una especie forestal nativa de Costa Rica, primero con el afán de implementar en el futuro una técnica para poder propagar la especie masivamente y segundo, para impulsar el desarrollo de procesos biotecnológicos que representen para el país nuevas opciones de mercado (nuevas alternativas para la reforestación).

En el contexto ambiental, se ha sentado un precedente para reproducir especies en peligro de extinción utilizando técnicas modernas de propagación, tratando de rescatar parte del patrimonio ecológico de Costa Rica.

Los resultados de esta investigación han generado grandes expectativas en cuanto a la factibilidad de aplicar esta técnica en el campo forestal, e incluso, estos resultados han brindado un aporte significativo al desarrollo biotecnológico del país promoviendo el interés por implementar estas técnicas en los sectores productivos. Además, se le está dando continuidad a la escasa investigación que se ha generado en cuanto a la reproducción "*in vitro*" de especies nativas con potencial económico para el país.

Si se lograra culminar este proceso, se estaría aportando una alternativa para el desarrollo rural al ofrecer una nueva especie para el

cultivo de árboles de las zonas altas de nuestro país. Con esto, se podría incentivar la reforestación, proporcionar empleos, aumentar el valor agregado de los productos forestales generando mayores divisas para el país, fijando carbono (CO<sub>2</sub>), disminuyendo la erosión, recuperando suelos degradados, fomentando el rescate de especies en peligro de extinción, etc.

### Referencias bibliográficas

- Arnáez S, E; Moreira G, I. 1992. *Estudio morfológico de semillas de especies forestales*. Especies de zonas altas. Taller de publicaciones del ITCR, Cartago. Costa Rica. pp. 102.
- Calle, V; Torres, Y; Marín, A. 1996. *Adelantos en la propagación vegetativa de pino colombiano (Prumnopitys spp) por cultivo de yemas in vitro*. Smurfit Cartón de Colombia. Informe de investigación No 178. 12 p.
- Jiménez M, Q; Poveda A, L. 1991. *Árboles maderables nativos de Costa Rica*. Imprenta Nacional, Museo Nacional de Costa Rica, San José. pp. 32.
- Rojas, F; Arnáez, E; Moreira, I; Torres, G. 1993. *Ciprecillo (Prumnopitys standleyi)*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cuadernos Científicos y Tecnológicos, Especies Forestales Tropicales n° 9. pp. 4.