

Efecto de la deshidratación y la sacarosa en la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King

Raúl Collado*, Raúl Barbón, Daniel Agramonte, Felipe Jiménez-Terry, Martha Pérez, Odalys Gutiérrez, Mariana La O. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: raulc@ibp.co.cu

RESUMEN

Para mejorar la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* se evaluó el efecto de la deshidratación y el aumento de la concentración sacarosa en el medio de cultivo. Se evaluaron tres tiempos de deshidratación (48, 72 y 96 horas) y tres concentraciones de sacarosa (4.0, 6.0 y 8.0 %) en experimentos independientes. Después de 60 días de cultivo se cuantificó el número de embriones somáticos que permanecieron vivos, germinaron y mostraron embriogénesis secundaria. Se comprobó que la germinación de los embriones somáticos fue afectada con el proceso de deshidratación, sin embargo, el cultivo de los embriones durante 30 días en un medio de cultivo con 4.0 y 6.0% de sacarosa y posteriormente transferirlos al medio de cultivo de germinación incrementó el número de embriones germinados sin afectar la supervivencia y con desarrollo normal de brote y raíz.

Palabras clave: agente osmótico, deshidratación, embriones somáticos, germinación

ABSTRACT

In order to improve the germination of somatic embryos of *Swietenia macrophylla* the effect of the dehydration and the increase of sucrose concentration in culture medium were evaluated. Three times of dehydration (48, 72 and 96 hours) and three sucrose concentration (4.0, 6.0 and 8.0%) were evaluated in independent experiments. After 60 days of culture the number of somatic embryos that remained alive, germinated and showed secondary embryogenesis was quantified. It was verified that the germination of the somatic embryos was affected with the dehydration process; nevertheless, the culture of the embryos during 30 days in culture medium with 4.0 and 6.0% of sucrose and later to transfer them to germination medium increased the number of germinated embryos without affecting the survival and with normal development of bud and root.

Key words: dehydration, germination, osmotic agent, somatic embryos

INTRODUCCIÓN

Swietenia macrophylla King, es una especie agroforestal de importancia para Cuba y el mundo. La calidad de la madera y el alto valor comercial de la misma han provocado la disminución acelerada de sus ejemplares. Como solución alternativa para aumentar la cantidad de plantas. En esta especie se ha logrado la regeneración de plantas por embriogénesis somática, aunque la germinación y conversión de los embriones es aún baja.

Durante la maduración el embrión somático sufre expansión de sus células y la acumulación de sustancias de reserva (Márquez *et al.*, 2003). Al respecto Choi y Jeong (2003), mencionan que un tratamiento de deshidratación parcial o total del embrión somático en *Siberian ginseng* aumenta su posterior germinación y crecimiento, además de facilitar el crecimiento simultáneo de la raíz y el brote.

El papel de la deshidratación como desencadenante de la germinación en embriones somáticos, ha sido previamente descrito por diferentes autores en varias

especies como *Hardwickia binata* (Chand y Kumar, 2001), *Gossypium hirsutum* (Kumria *et al.*, 2003) y *Acacia caven* (Marinucci *et al.*, 2004). Desecaciones parciales de embriones somáticos con pérdidas de agua muy pequeñas, han sido suficientes en especies como *Laurus nobilis* (Tako *et al.*, 2002) o *Pinus roxburghii* (Ravindra *et al.*, 2006) para incrementar significativamente la germinación. Por otro lado el uso de algunos agentes osmóticos como la sacarosa y el manitol, también pueden tener efectos positivos en la maduración de embriones somáticos (Abedini *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que, además del ácido absísico (ABA), agentes osmóticamente activos como sacarosa o manitol pueden inhibir el proceso de germinación precoz, siendo en algunos casos más efectivo el establecimiento de altas presiones osmóticas en el medio de cultivo que el aporte exógeno de ABA (Márquez *et al.*, 2003).

El cultivo de embriones somáticos en medios de cultivo con concentraciones de sacarosa (4 - 9%) se han utilizado en especies leñosas como *Quercus*

robur (Zegzouti *et al.*, 2001), *Gossypium hirsutum* (Kumria *et al.*, 2003), *Acacia caven* (Marinucci *et al.*, 2004), para mejorar la germinación. Sin embargo, en *Swietenia macrophylla* King no se ha encontrado información en la literatura científica consultada sobre la utilización de este agente osmótico.

Por estas razones y con el objetivo de evaluar el efecto de la deshidratación y el aumento de la concentración sacarosa en el medio de cultivo sobre la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* se realizó este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron embriones somáticos en etapa cotiledonal formados en medio de cultivo semisólido compuesto por la mitad de las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS) al que se le adicionó ácido nicotínico 1.0 mg.l⁻¹, piridoxina 1.0 mg.l⁻¹, 6-bencilaminopurina (6-BAP) 1.0 mg.l⁻¹ y sacarosa 3.0%, según la metodología desarrollada por Collado *et al.* (2005).

Efecto de la deshidratación

Para mejorar la germinación de los embriones somáticos se empleó el método de deshidratación descrito por Choi y Jeong (2003), que consistió en colocar los embriones somáticos sobre la superficie de un papel de filtro estéril dentro de un frasco de cultivo en condiciones de oscuridad constante y a una temperatura de 27.0 ± 2.0°C.

Se estudiaron tres tiempos de deshidratación: 48, 72 y 96 horas. Posteriormente fueron colocados en un medio de cultivo de germinación compuesto por la mitad de las sales MS, vitaminas MS 10ml.l⁻¹, 2.0% de sacarosa, 3.0 g.l⁻¹ de Gelrite y el pH fue ajustado a 5.8, antes de la esterilización. Como control se emplearon embriones somáticos en etapa cotiledonal sin aplicación del proceso de deshidratación. Se colocaron 20 embriones somáticos por frasco de cultivo y se realizaron 10 repeticiones. Fueron realizadas observaciones cada 10 días y a los 60 días de cultivo se evaluaron las variables: número de embriones somáticos vivos expresados como supervivencia, número de embriones somáticos con germinación completa y número de embriones somáticos con embriogénesis somática secundaria.

Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa

Con el objetivo de incrementar la germinación, embriones somáticos en etapa cotiledonal, fueron cultivados en diferentes concentraciones de sacarosa (4.0, 6.0 y 8.0%). El medio de cultivo base empleado

estuvo compuesto por las sales MS al 100%, 10 ml.l⁻¹ de vitaminas MS, 200 mg.l⁻¹ de L-glutamina, 3.0 g.l⁻¹ de Gelrite y el pH fue ajustado a 5.8, antes de la esterilización. Como control se utilizaron embriones somáticos en etapa cotiledonal que fueron cultivados en el mismo medio de cultivo con 2.0% de sacarosa.

Se colocaron siete embriones somáticos por frasco de cultivo y se realizaron 10 repeticiones, para un total de 70 embriones somáticos por tratamiento, los cuales fueron situados en condiciones de oscuridad constante y a una temperatura de 27.0 ± 2.0°C durante 30 días.

Transcurrido este tiempo, los embriones somáticos fueron transferidos al medio de cultivo de germinación descrito anteriormente en el que permanecieron durante 30 días más.

Se realizaron observaciones a intervalos de 10 días para apreciar cambios morfológicos (incremento de tamaño, cambio de coloración y pronunciación del polo radicular) en los embriones somáticos. A los 60 días de cultivo se evaluaron las siguientes variables: número de embriones somáticos vivos que será expresado como supervivencia, número de embriones somáticos con germinación completa, número de embriones somáticos con embriogénesis somática secundaria y número de embriones somáticos deformados.

Los datos experimentales se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple y la diferencia entre los tratamientos se determinó con la aplicación de la prueba de rangos múltiples de Duncan. El paquete estadístico empleado fue Statgraphics Plus versión 5.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la deshidratación

Los resultados demostraron que la deshidratación afectó la germinación de los embriones somáticos en *Swietenia macrophylla* King, ya que con los tres tratamientos estudiados (48.0, 72.0, 96.0 horas de deshidratación) se lograron valores de germinación inferiores al control (Tabla 1).

Los embriones somáticos deshidratados durante 72 y 96 horas al transcurrir 30 días de cultivo en el medio de germinación presentaron mortalidad, por lo que disminuyó el porcentaje de supervivencia de los mismos. Los valores más bajos de esta variable se presentaron en el tratamiento donde los embriones somáticos fueron expuestos al mayor tiempo de deshidratación (Tabla 1). Resultados similares fueron obtenidos por Chand y Kumar (2001), los cuales realizaron estudios sobre la deshidratación de embriones somáticos en la fase de maduración en

la especie *Hardwickia binata* Roxb y demostraron que los embriones somáticos expuestos a este proceso durante 72 o más horas presentaron posteriormente afectaciones en la supervivencia.

Cuando los embriones somáticos fueron expuestos a diferentes tiempos de deshidratación el número de embriones somáticos con germinación completa disminuyó. El mayor valor de esta variable lo presentó el control y mostró diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Con este resultado se demostró que en la especie *Swietenia macrophylla* King, la deshidratación de los embriones somáticos por el método empleado y en los tiempos probados, influyó negativamente en la germinación. Este resultado no coincide con lo planteado por Choi y Jeong (2003) que en la especie *Siberian ginseng* incrementaron los porcentajes de germinación después de haber expuesto los embriones somáticos a 72 horas de deshidratación. Sin embargo, coincide con Kumria *et al.* (2003) quienes demostraron que la deshidratación de los embriones somáticos en *Gossypium hirsutum* no indujo respuesta positiva en este proceso.

En todos los tratamientos estudiados, así como en el control se observaron grupos de embriones

somáticos en etapa globular sobre la base de los embriones somáticos en etapa cotiledonal, característica que demostró la presencia de embriogénesis somática secundaria. Los porcentajes de embriogénesis secundaria no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos evaluados. Sin embargo, a diferencia de los resultados presentados en este trabajo, algunos autores han encontrado que con la exposición de los embriones somáticos a tiempos de deshidratación durante 48–96 horas se reduce la embriogénesis somática secundaria asociada a los mismos en especies como abeto blanco (Roberts *et al.*, 1999) y *Acacia caven* (Marinucci *et al.*, 2004).

Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa

La adición de sacarosa de 4.0 a 8.0% al medio de cultivo incrementó la germinación de los embriones somáticos en *Swietenia macrophylla* y mostraron diferencias significativas respecto al control (Tabla 2). Los embriones somáticos cultivados con 6.0% de sacarosa presentaron el mayor valor de germinación.

Tabla 1. Efecto de diferentes tiempos de deshidratación sobre la supervivencia y la germinación de embriones somáticos en *Swietenia macrophylla* a los 60 días de cultivo.

Tiempo de deshidratación (horas).	Supervivencia No. ES/frasco	Germinación completa No. ES/frasco
0	20.00 a	11.14 a
48	20.00 a	10.24 b
72	18.20 b	7.27 c
96	15.17 c	4.28 d
E. E.	± 0.21	± 0.22

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente para ($p < 0.05$) según la prueba de Duncan. ES- embriones somáticos. EE- error estándar

Tabla 2. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa sobre la supervivencia y la germinación completa de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King a los 60 días de cultivo.

Concentraciones de sacarosa (%)	Supervivencia No. ES/frasco	Germinación completa No. ES/frasco
2.0	7.00 a	2.74 d
4.0	7.00 a	4.59 b
6.0	7.00 a	5.33 a
8.0	6.51 b	3.77 c
E. E.	± 0.08	± 0.11

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan. ES- embriones somáticos. EE- error estándar

El número de embriones germinados del tratamiento con la mayor concentración de sacarosa (8.0%) fue inferior a los tratamientos con 4.0 y 6.0% de sacarosa aunque superior al control. Resultados similares fueron obtenidos por Abedini *et al.* (2000), los cuales señalaron que en la especie *Acacia caven* el cultivo de los embriones somáticos con concentraciones de sacarosa superiores al 7.5% produjeron afectación en la germinación.

Además, este mismo tratamiento (8.0%) la supervivencia disminuyó y fue significativamente inferior al resto de los tratamientos (Tabla 2). Resultados similares fueron informados por Márquez *et al.* (2003), los cuales realizaron estudios sobre la influencia de agentes osmóticos activos en la fase de maduración de embriones somáticos de *Persea americana* L. Estos autores demostraron que los embriones somáticos cultivados con concentraciones de sacarosa superiores a 7.5% durante períodos de 15 y 30 días posteriormente presentaron afectaciones en la supervivencia.

En los medios de cultivo con sacarosa se observaron cambios morfológicos en los embriones. A los 30 días de cultivo los embriones somáticos mostraron una apariencia diferente en los medios de cultivo con 6.0 y 8.0 % de sacarosa. Se observó un incremento de tamaño, así como una coloración blanca opaca y pronunciación del polo radicular. Los embriones somáticos cultivados en el tratamiento con 4.0 % de sacarosa mantuvieron el color blanco translúcido, aunque también con un aumento de tamaño (Figura 1).

Se ha demostrado que los agentes osmóticos activos como la sacarosa pueden inhibir el proceso de germinación precoz y en algunos casos es más efectivo el establecimiento de alta presión osmótica en el medio de cultivo que el aporte exógeno de ácido absísico (ABA) (Perán-Quesada, 2001). En la especie *Persea americana* L., Márquez *et al.* (2003), demostraron que el cambio de color de blanco-traslúcido a blanco-opaco en los embriones somáticos, fue una respuesta al incremento de sustancias de reserva, lo cual mejoró la maduración. Estos autores obtuvieron la mayor cantidad de embriones blancos-opacos cuando adicionaron al medio de cultivo de 5.0 a 7.0 % de sacarosa.

En número de embriones somáticos con embriogénesis somática secundaria en todos los tratamientos evaluados fue inferior al control (Tabla 3).

Los valores inferiores de embriones somáticos con embriogénesis somática secundaria presentados en los tratamientos con 4.0% - 8.0% de sacarosa, demostraron que estos alcanzaron una etapa de desarrollo más avanzada con respecto al control. Estos resultados coinciden con Fernández *et al.* (1995), los mismos señalaron que en la especie *Quercus suber* L, los embriones somáticos cultivados en un medio de cultivo MS con concentraciones de sacarosa entre 6.0 y 9.0 %, presentaron porcentajes de embriogénesis somática secundaria inferiores con respecto a los embriones somáticos que no recibieron tratamiento con sacarosa.

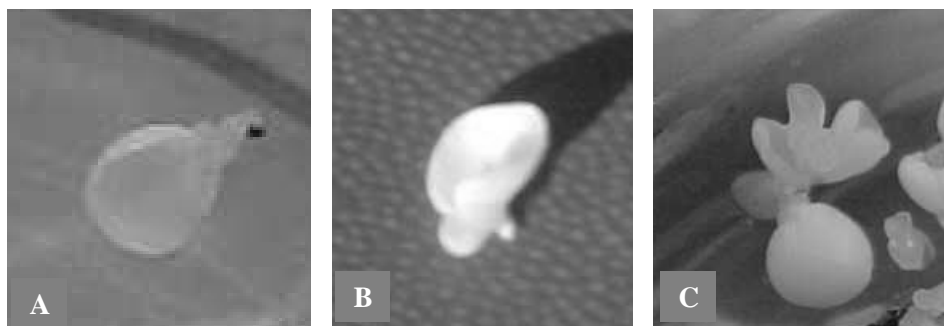


Figura 1. Embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* en el medio de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa a los 30 días de cultivo A) 4.0 %, B) 6.0 %, C) 8.0 %.

Tabla 3. Efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo sobre la embriogénesis secundaria y el número de embriones malformados en *Swietenia macrophylla* a los 60 días de cultivo.

Concentraciones de sacarosa (%)	ES con Embriogénesis secundaria No. ES/frasco	ES malformados No. ES/frasco
2.0	2.88 a	0.09 d
4.0	1.83 b	0.30 c
6.0	1.69 c	0.67 b
8.0	1.65 c	1.24 a
E. E.	± 0.03	± 0.02

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente para ($p < 0.05$) según la prueba de Duncan. ES- embriones somáticos. EE- error estándar

En otra especie leñosa como *Quercus robur* L., Cuenca *et al.* (1999) y Zegzouti *et al.* (2001), mencionaron que con el aumento del estado de madurez de los embriones somáticos, disminuyó la embriogénesis somática secundaria. Estos autores demostraron con el empleo de técnicas de cortes histológicos, que los embriones somáticos cultivados durante 30 días con concentraciones entre 6.0 y 9.0 % de sacarosa, presentaron un número de células embriogénicas predeterminada muy bajo al ser comparados con embriones somáticos inmaduros.

En todos los tratamientos evaluados se presentaron embriones somáticos que no germinaron y aumentaron hasta tres veces su tamaño inicial, los mismos adquirieron forma redondeada con aspecto hiperhídrico a los cuales se denominaron embriones somáticos malformados. Los valores más altos se presentaron en el tratamiento donde los embriones somáticos fueron cultivados con la mayor concentración de sacarosa (8.0%) con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 3).

Varios autores han señalado que la adición de concentraciones de sacarosa (5.0 – 10.0 %) al medio de cultivo es una de las causas que aumenta la malformación de los embriones somáticos (Fernández *et al.*, 1995; Cuenca *et al.*, 1999; Svobodova *et al.*, 1999). Comportamientos similares en el porcentaje de embriones somáticos deformados han sido descrito por Zegzouti *et al.* (2001), para embriones somáticos cultivados con 8% de sacarosa en *Quercus robur* L.

CONCLUSIONES

Se comprobó que la deshidratación de los embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* afectó su germinación. Sin embargo, el cultivo de los embriones durante 30 días en un medio de cultivo con 4.0 y 6.0% de sacarosa y posteriormente transferirlos al medio de cultivo de germinación incrementó el número de embriones germinados sin afectar la supervivencia y con desarrollo normal de brote y raíz.

REFERENCIAS

Abedini, W, Boeri P, Marinucci L, Ruscitti M, Scelzo L (2000) Biotécnicas aplicadas a especies forestales nativas. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales 9: 31-43

Chand, S, Kumar A (2001) Direct somatic embryogenesis from zygotic embryos of a timber-yielding leguminous tree, *Hardwickia binata* Roxb. Current Science 80: 7-10

Choi, Y, Jeong J (2003) Dormancy induction of somatic embryos of Siberian ginseng by high sucrose concentrations enhances the conservation of hydrated artificial seeds and dehydration resistance. Plant Cell Reports 20: 1112–1116

Collado, R, Barbón R, Agramonte D, Jiménez F, Pérez M, Gutierrez O (2005) Diferenciación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King en medio de cultivo semisólido. En: Memorias Congreso Internacional Biotecnología Agrícola (BioVeg 2005). Ciego de Avila. Cuba

Cuenca, B, San-José M, Martínez M, Ballester A, Vieitez A (1999) Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. Plant Cell Reports 18: 538-543

Fernández, B, Celestino C, Toribio M (1995) Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41: 99-106

Kumria, R, Sunnichan V, Das D, Gupta S, Reddy V, Bhatnagar R, Leelavathi S (2003) High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. Plant Cell Reports 21:635–639

Marinucci, L, Ruscitti, M, Abedini, W (2004) Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la Republica Argentina. Rev. Fac. Agron. (La Plata) 105: 27-36

Márquez, B, Sánchez C, Perán R, Barceló A (2003) Factores que afectan a la obtención de embriones somáticos blanco-opacos de aguacate. Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate). Universidad de Málaga. España

Medina, M, Sotolongo R (2004) Avances en el cultivo de tejidos de *Swietenia macrophylla* King. X *Swietenia mahogani* Jaco. Revista Forestal Baracoa (2) 23: 19-26

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

Parrott, W (2002) La embriogénesis somática en los angiospermas. En: Resúmenes: VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal, Santa Clara, Cuba. 156p.

Perán-Quesada, R, Sánchez C, Márquez B, Barceló A, Pliego F (2001) Efecto del medio de cultivo sobre la maduración y germinación de embriones somáticos de aguacate. Actas de Horticultura 28: 111-115

Ravindra, B, Malabadi, Nataraja K (2006) Cryopreservation and plant regeneration via somatic embryogenesis using shoot apical domes of mature *Pinus roxburghii* Sarg. trees. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 42: 152–159

Roberts, D, Flinn, B, Sutton, B (1999) Desiccation promotes and synchronizes the germination of white spruce somatic embryos. Plant Physiology 89: 49-51

Svobodová, H, Albrechtová, J, Kumstyrova, L, Lipavská H, Vágner M, Vondráková Z (1999) Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. Plant Physiol Biochem 37: 209-221

Takos, I, Konstantinidou, E, Merou, T (2002) The effect of desiccation on the somatic embryo germination of *Laurus nobilis* L. Plant Physiology and Biochemistry 40: 1043-1049

Zegzouti, R, Arnould M, Favre J (2001) Histological investigation of the multiplication step in secondary somatic embryogenesis of *Quercus robur* L. EDP Sciences 58: 681-690