

Embriogénesis somática directa en *Swietenia macrophylla* King

Raúl Collado, Raúl Barbón, Daniel Agramonte, Felipe Jiménez-Terry, Martha Pérez, Odalys Gutiérrez. *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

Swietenia macrophylla King es difícil de propagar mediante el cultivo de tejidos y no se cuenta con un sistema vía organogénesis, repetible, debido básicamente a problemas de contaminación microbiana, oxidación fenólica y muerte de los tejidos en la fase de establecimiento *in vitro* de los explantes. Con el objetivo de establecer un protocolo para la obtención de embriones somáticos, se emplearon embriones cigóticos como material vegetal inicial. Se estudiaron tres concentraciones de 2,4-D, para lograr la formación de embriones somáticos. Se evaluó a las seis semanas de cultivo, el número de explantes con embriogénesis somática de alta frecuencia y baja frecuencia. Para que los embriones somáticos en etapa globular alcanzaran las etapas finales de torpedo y cotiledonal, estos se colocaron en tres tratamientos con 6-BAP. A los 30 días de cultivo se evaluaron el número de embriones somáticos que alcanzaron las etapas de torpedo y cotiledonal. Los resultados demostraron que en un medio de cultivo compuesto por las sales MS con 4.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg.l⁻¹ de kinetina se logra el desarrollo de la embriogénesis somática directa a partir de embriones cigóticos inmaduros. Con 0.4 mg.l⁻¹ de 6-BAP se obtuvo el mayor porcentaje de embriones somáticos en etapa cotiledonal (91.70 %).

Palabras clave: caoba, cultivo de tejidos, embrión somático, forestal, reguladores de crecimiento

ABSTRACT

Swietenia macrophylla King is difficult to be propagated by tissue culture and there is not an efficient system via organogenesis, due to problems of microbial contamination, phenolic oxidation and death of tissue in the phase of *in vitro* establishment of explants. In order to establish a protocol for obtaining somatic embryos, zygotic embryos were used as initial plant material. Three combinations of 2,4-D with kinetin were studied, to obtain the formation of somatic embryos. After six weeks of culture, the number of explants with high and low somatic embryogenesis frequency were determined. So that the somatic embryos in globular stage reach the final stages of torpedo and cotyledonal, these were placed in three treatments with 6-BAP (0.2, 0.4 y 0.6 mg.l⁻¹). The number of somatic embryos that reached the torpedo and cotyledonal stages were evaluated after 30 days of culture. Results demonstrated that direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos is obtained in the culture medium composed by MS salts with 4.0 mg.l⁻¹ of 2,4-D and 1.0 mg.l⁻¹ of kinetin. Higher percentage of somatic embryos in cotyledonal stage (91.7 %), was obtained with 0.4 mg.l⁻¹ of 6-BAP.

Key word: forestry, growth regulator, mahogany, somatic embryo, tissue culture

INTRODUCCIÓN

La caoba (*Swietenia macrophylla* King), está considerada como la especie arbórea más comercial del trópico. La creciente demanda de madera de caoba sobrepasa la oferta disponible y aumenta la presión sobre esta especie, lo que ocasiona una disminución de las poblaciones naturales y ha provocado su extinción comercial a lo largo de su área de distribución (Reynel *et al.*, 2003).

El uso de la biotecnología como un apoyo a los programas de reforestación es una posibilidad que aliviaría la presión de deforestación que tienen las poblaciones naturales y de esta manera evitaría su extinción (Verdeil *et al.*, 1999).

En la caoba, la propagación por vías tradicionales no resuelve los problemas de déficit de material

vegetal para fomentar plantaciones ya sea con el objetivo de reforestar o para la producción comercial de madera. Esta especie ha demostrado ser difícil de propagar mediante el cultivo de tejidos. No se cuenta con un sistema de regeneración de plantas vía organogénesis, repetible, debido básicamente a problemas de contaminación microbiana, oxidación fenólica y muerte de los tejidos, en la fase de establecimiento *in vitro* de los explantes. Se hace necesario entonces la búsqueda de un nuevo método de propagación para dar solución a los problemas antes mencionados (Rodríguez *et al.*, 2003).

La embriogénesis somática es uno de los métodos utilizados para la propagación en algunas especies forestales tales como *Eucalyptus nitens*, *E. globulus*, *Picea abies*, *Pinus taeda* y *Pinus radiata*. El proceso de embriogénesis somática tiene la ventaja de ser sensible a la automatización y mecanización,

generando una alta producción de plantas iniciales para el establecimiento de plantaciones (Peña y Lezcano, 2001).

El desarrollo de tecnologías de gran eficiencia desde el punto de vista biológico, cuantitativo y económico, que faciliten un mayor grado de automatización en los procesos de almacenamiento y multiplicación de germoplasma valioso, permitirá a su vez disminuir los costos en la producción de plantas *in vitro*, lo que resulta altamente beneficioso para especies de interés agroforestal como la caoba (Medina y Sotolongo, 2004).

Basados en la necesidad de desarrollar protocolos de propagación *in vitro* para esta especie se trazó como objetivo de trabajo formar y diferenciar embriones somáticos a partir de embriones cigóticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Como material vegetal inicial se emplearon embriones cigóticos extraídos de semillas de frutos inmaduros recolectados de plantas adultas de *Swietenia macrophylla* King seleccionadas por sus características agromorfológicas en el Jardín Botánico de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (UCLV).

Inducción de la embriogénesis somática directa

Para lograr la formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros, se estudiaron tres concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (2.0, 4.0 y 6.0 mg.l⁻¹) combinado con 1.0 mg.l⁻¹ de kinetina.

El medio de cultivo utilizado estuvo compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS), 200 mg.l⁻¹ de L-glutamina, 1.0 mg.l⁻¹ de tiamina, 1.0 mg.l⁻¹ de ácido nicotínico, 1.0 mg.l⁻¹ de piridoxina, 200 mg.l⁻¹ de extracto de malta y 4.0 % de sacarosa.

Se colocó un embrión cigótico por tubo de cultivo (21 x 180 mm) y se realizaron 80 repeticiones. El material vegetal se colocó en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 27.0 °C ± 2.0. Se efectuaron observaciones cada siete días para describir los cambios morfológicos presentados por los embriones cigóticos y el tiempo de aparición de los embriones somáticos. Se determinó al final del experimento (a las seis semanas de cultivo), el número de explantes con embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF) y embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF).

Desarrollo de embriones somáticos

Con el objetivo de lograr el desarrollo de los embriones somáticos en etapa globular a las etapas de torpedo y cotiledonal, se tomaron los embriones somáticos obtenidos en el mejor tratamiento de inducción de la embriogénesis somática directa. Los mismos fueron colocados en tres tratamientos con 6-BAP (0.2, 0.4 y 0.6 mg.l⁻¹) y un control sin reguladores de crecimiento.

El medio de cultivo empleado estuvo compuesto por las sales MS, 250 mg.l⁻¹ de L-glutamina, 10 ml.l⁻¹ de las vitaminas MS y 3.0 % de sacarosa.

Se colocaron diez embriones somáticos, en etapa globular, por frasco de cultivo y se realizaron 20 repeticiones por tratamiento. Para cuantificar el número de embriones somáticos que alcanzaron la etapa de torpedo, a los 30 días de cultivo, se extrajeron del frasco y se situaron sobre una placa de Petri.

Los frascos se colocaron en condiciones de oscuridad, a temperatura de 27.0 °C ± 2.0.

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

Inducción de la embriogénesis somática

Durante las dos primeras semanas de cultivo se observaron cambios de coloración y morfológicos en los embriones cigóticos.

A las seis semanas de colocados los explantes en el medio de cultivo para la inducción de la embriogénesis somática, sobre los cotiledones de los embriones cigóticos se observó la presencia de embriogénesis somática directa de alta y baja frecuencia, en todos los tratamientos (Figura 1).

La embriogénesis somática directa de alta frecuencia se caracterizó por la presencia de grupos con un gran número de proembriones y embriones somáticos en etapa globular, de color blanco amarillento. Sin embargo, en la embriogénesis somática de baja frecuencia se observaron embriones somáticos aislados y en diferentes etapas de desarrollo. Estos se caracterizaban también por poseer una coloración blanca.

Con las combinaciones de diferentes concentraciones de 2,4-D con kinetina se indujo el proceso de la embriogénesis somática en *Swietenia macrophylla* King. En dependencia de estas concentraciones variaron significativamente los porcentajes de explantes con embriogénesis somática de alta frecuencia y embriogénesis somática de baja frecuencia.

Los mayores porcentajes de embriones cigóticos que desarrollaron embriogénesis somática de alta frecuencia y embriogénesis somática de baja frecuencia, se obtuvieron en el medio de cultivo con 4.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D (Tabla 1). Este tratamiento mostró diferencias estadísticas con el resto de las combinaciones de los reguladores de crecimiento estudiados.

Los resultados presentados en este experimento demostraron el efecto positivo del 2,4-D combinado con la kinetina en la inducción de la embriogénesis somática directa en la especie *Swietenia macrophylla* King empleando embriones cigóticos como explante inicial.

En trabajos realizados sobre la inducción de la embriogénesis somática en el género *Swietenia*, se

ha estudiado el efecto del 2,4-D (1.0 – 5.0 mg.l⁻¹) combinado con la Kinetina (0.5 – 2.0 mg.l⁻¹), en diferentes tipos de explantes como discos de hoja, ápices y segmentos nodales de plantas de semillas germinadas *in vitro*. Sin embargo, no se obtuvieron resultados alentadores en cuanto a la respuesta embriogénica (Maruyama e Ishii, 1999; Peña y Lezcano, 2001; Cruz da Rocha y Quoirin, 2004; Medina y Sotolongo, 2004).

Los resultados del efecto de la combinación de 2,4-D con Kinetina sobre la inducción de la embriogénesis somática, difirieron con los señalados por Shaji *et al.* (1997) en la meliácea *Naregamia alata*, en la cual no lograron una respuesta embriogénica. Sin embargo, Zhang (2000), planteó que con el empleo de 2,4-D en combinación con Kinetina (0.5–1.0 mg.l⁻¹) en la inducción de embriogénesis somática en *Gossypium hirsutum*, se logró la embriogénesis somática directa y los mayores valores de embriogénesis somática de alta frecuencia se manifestaron en los tratamientos donde al medio de cultivo se le adicionaron concentraciones entre 3.0 – 5.0 mg.l⁻¹ de dicha auxina.



Figura 1. Embriogénesis somática directa en *Swietenia macrophylla* King desarrollada a partir de embriones cigóticos a las seis semanas de cultivo (A- Embriogénesis somática de alta frecuencia y B- Embriogénesis somática de baja frecuencia).

Tabla 1. Efecto de diferentes combinaciones de 2,4-D y kinetina en la inducción de la embriogénesis somática directa a partir de embriones cigóticos en *Swietenia macrophylla* King a las seis semanas de cultivo.

Concentraciones de 2,4-D	Porcentaje de explantes con ESAF (%)	Porcentaje de explantes con ESBF (%)
2.0	30.25 c	15.38 c
4.0	41.02 a	20.51 a
6.0	34.28 b	17.71 b
E. E.	± 0.45	± 0.38

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente según la prueba de rangos múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

ESAF: embriogénesis somática de alta frecuencia.

ESBF: embriogénesis somática de baja frecuencia.

EE: Error Estándar.

En especies Meliáceas como *Azadirachta excelsa* y *Azadirachta indica*, Giagnacovo *et al.* (2001) y Salvi *et al.* (2001) señalaron que el empleo de embriones cigóticos inmaduros como explante inicial, en un medio de cultivo MS al que le adicionaron como reguladores de crecimiento el 2,4-D (2.0 – 8.0 mg.l⁻¹) combinado con kinetina (1.0 mg.l⁻¹), lograron la embriogénesis somática directa.

Los porcentajes de embriogénesis somática de alta frecuencia y embriogénesis somática de baja frecuencia, obtenidos en el presente trabajo con todas las combinaciones de 2,4-D y kinetina estudiadas fueron superiores a los logrados por Giagnacovo *et al.* (2001), 8.0 y 10.3 %, en la especie *Azadirachta excelsa*.

Quedó evidenciado, por primera vez, que con el empleo de un medio de cultivo compuesto por las sales MS con 200 mg.l⁻¹ de L-glutamina, 1.0 mg.l⁻¹ de tiamina, 1.0 mg.l⁻¹ de ácido nicotínico, 1.0 mg.l⁻¹ de piridoxina, 200 mg.l⁻¹ de extracto de malta y 4.0 % de sacarosa, con 4.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D combinado con 1.0 mg.l⁻¹ de kinetina se logró el desarrollo de la embriogénesis somática directa en *Swietenia macrophylla* King a partir de embriones cigóticos inmaduros.

Desarrollo de embriones somáticos

En el medio de cultivo para la diferenciación de embriones somáticos con 0.4 mg.l⁻¹ de 6-BAP, se observaron desde los diez días de cultivo embriones somáticos en etapas de torpedo y cotiledonal. Sin embargo, a los 30 días en todos los tratamientos

estudiados un alto porcentaje de embriones somáticos alcanzaron estas etapas de desarrollo, los cuales presentaron una coloración blanca, con cotiledones definidos. Sobre los cotiledones de los embriones somáticos en etapa cotiledonar se observaron grupos de embriones somáticos en etapa globular, característica que demostró la presencia de embriogénesis somática secundaria asociada (Figura 3).

Al comparar el efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP sobre el desarrollo de los embriones somáticos (Tabla 2), se observaron en todos los tratamientos estudiados embriones somáticos que alcanzaron las etapas de torpedo y cotiledonal. Los porcentajes más altos de embriones somáticos en estas etapas de desarrollo, se presentaron cuando se añadió al medio de cultivo 0.4 mg.l⁻¹ de 6-BAP con diferencias con respecto a los demás tratamientos.

En los tratamientos donde se adicionaron concentraciones de este regulador de crecimiento al medio de cultivo, se obtuvieron resultados superiores con respecto al control.

Resultados similares relacionado con el empleo de bajas concentraciones de 6-BAP (0.2-0.5 mg.l⁻¹) en la histodiferenciación de los embriones somáticos fueron obtenidos en otras especies de meliáceas como *Cedrela fissilis* y *Cedrela odorata* (Da Costa *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2003). Esta citoquinina también fue utilizada para el desarrollo de embriones somáticos en *Pinus taeda* (Pullman *et al.*, 2005).

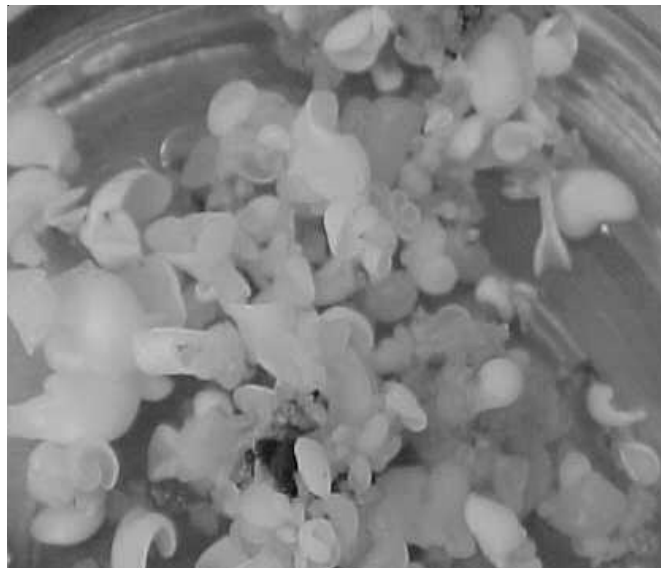


Figura 3. Embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King que alcanzaron las etapas de torpedo y cotiledonal en el medio de cultivo para la diferenciación con 0.4 mg.l⁻¹ de 6-BAP a los 30 días de cultivo.

Tabla 2. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP sobre el desarrollo de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King a los 30 días de cultivo.

Concentraciones de 6-BAP (mg.l ⁻¹).	Embriones somáticos en etapa torpedo (%)	Embriones somáticos en etapa cotiledonal (%)
0.0	5.60 c	75.20 d
0.2	6.70 b	79.80 c
0.4	7.40 a	91.70 a
0.6	7.10 ab	86.30 b
E. E.	± 0.14	± 0.11

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente para ($p < 0.05$) según la prueba de Duncan. E.E: Error Estándar

CONCLUSIONES

Se logró formar y diferenciar embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King a partir de embriones cigóticos. Los mayores porcentajes de embriogénesis somática se alcanzaron en un medio de cultivo con 4.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg.l⁻¹ de kinetina.

El empleo de una concentración de 0.4 mg.l⁻¹ de 6-BAP en el medio de cultivo para la diferenciación de los embriones somáticos, permitió obtener el mayor porcentaje de embriones somáticos en etapa cotiledonal (91.70 %).

REFERENCIAS

Cruz da Rocha, S, Quoirin M (2004) Calogéneses e Rizogéneses em Explantes de Mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. Ciencia Forestal 14: 91-101

Da Costa, E, Volkmer de Castillo C, Netto F, Viana A (2002) *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (*Meliaceae*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70: 259 – 268

Giagnacovo, G, Pasqua G, Monacelli B, Van S, Maccioni O y Vitali F (2001) Organogenesis and embryogenesis from callus cultures of *Azadirachta excelsa*. Plant-biosystems 135:13-18

Maruyama, E, Ishii K (1999) Somatic Embryogenesis in Big-Leaf Mahogany (*Swietenia macrophylla* King). Somatic embryogenesis in woody plants 5: 45-63

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

Muñoz, S (2003) Embriogénesis somática en Cedro (*Cedrela odorata* L.) a partir de cotiledones. Trabajo de diploma en opción al título de licenciado en biología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú

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, IBP UCLV. Santa Clara, Cuba.

Peña, J, Lezcano J (2001) Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King x *Swietenia mahogany* Jacq. Trabajo de diploma en opción al título de ingeniero forestal, Universidad de Pinar del Río Hermanos Saíz Montes de Oca, Pinar del Río.

Pullman, G, Johnson S, Van Tassel S, Zhang Y (2005) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MES pH buffer, biotin, and folic acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 91-103

Reynel, C, Pennington R, Pennington T, Flores C, Daza A (2003) Árboles útiles de la Amazonía Peruana. Manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies. Perú

Rodríguez, R, Daquinta M, Capote I, Pina D, Lescano Y, Gonzáles-Olmedo J (2003) Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahogani* (Caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (cedro). Cultivos Tropicales 24: 23-27

Salvi, D, Singh H, Tivarekar S, Eapen S (2001) Plant regeneration from different explants of neem. Plant Cell Tissue and Organ Culture 65: 159-162

Shaji, J, Soniya E, Valsala K, Nair G (1997) *In vitro* adventitious shoot formation from mature leaves and leaf derived calli of *Naregamia alata*. Indian Journal of Experimental Biology 35:1249-1251

Verdeil, JL, Hornung R, Huet C, Jacobsen H-J, Rillo E, Oropeza C, Bourdeix R, N'cho Y-P, Hocher V, Hamon S, Sangare A (1999) Recent progress on coconut micropropagation through a joined effort involving different countries. En: Oropeza C, Verdeil JL, Ashburner GR, Cárdena R y Santamaría JM (Eds). Current Advances in Coconut Biotechnology, pp. 391-405. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Zhang, BH (2000) Regulation of plant growth regulators on cotton somatic embryogenesis and plant regeneration. Biochemistry 39: 1567