

Establecimiento *in vitro* de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King

Raúl Collado*, Raúl Barbón, Daniel Agramonte, Felipe Jiménez, Martha Pérez, Odalys Gutiérrez, Daymí Ramírez.
*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. CP-54 830. Cuba. e. mail: racollado76@yahoo.es

RESUMEN

La aplicación de técnicas de cultivo de tejidos en plantas leñosas, ofrece una alternativa valiosa para la propagación de árboles élite. Con el objetivo de lograr el establecimiento *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King), se partió de brotes jóvenes tomados de plantas sembradas en condiciones de campo. Para la desinfección del material vegetal fueron estudiadas dos concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) combinadas con tres tiempos de exposición. Se evaluaron los porcentajes de las variables: explantes contaminados, explantes necrosados y supervivencia. Los segmentos nodales y las yemas apicales fueron cultivados en condiciones ambientales controladas de luz y temperatura, en un medio de cultivo MS con reducción de los nitratos a la mitad y suplementado con cinco concentraciones de citoquinina (6-BAP). En todos los ensayos se realizaron 40 repeticiones por tratamiento y se colocó un explante por tubo de ensayo con 10 ml de medio de cultivo. A los 28 días de cultivo se evaluaron las variables porcentaje de explantes brotados y longitud promedio del brote (cm). El establecimiento de vástagos vigorosos de caoba se logró con una concentración de 0.2 mg.l⁻¹ 6-BAP con el empleo de segmentos nodales como explante, paso inicial de una propagación directa.

Palabras clave: brotes, desinfección, explantes, forestales, micropropagación

ABSTRACT

The application of tissue culture techniques in woody plants offers a valuable alternative for the propagation of elite trees. With the objective of obtaining the *in vitro* establishment of mahogany (*Swietenia macrophylla* King), the starting material were young buds taken from plants in field conditions. For the disinfection of the vegetal material two concentrations of hypochlorite of sodium (NaClO) combined with three times of exposition were studied. The percentage of the variables contaminated explants, necrotic explants and survival, were evaluated. Later, the method of disinfection of the explants was determined. The nodules segments and apical buds were cultivated under environmental conditions of controlled light and temperature, in a culture medium of MS with reduction of nitrates to the half and supplemented with five concentrations of cytokinin (6-BAP). In all the tests forty repetitions by treatment were made and one explant by essay tube with 10 milliliters of culture medium. The evaluations were carried out at the 28 days and the percentage of the variables explants sprouted and average length of the bud in (cm) were evaluated. For the disinfection of the explants the suitable concentration of NaClO and the time of exposition of the explants to the same one were determined. The establishment of vigorous shoots of mahogany was obtained with a concentration of 0.2 mg.l⁻¹ 6-BAP with the use of nodular segments as explants, initial step of a direct propagation.

Key words: disinfection, explants, forest, micropropagation, sprout

INTRODUCCIÓN

Las Meliáceas poseen un alto valor comercial, que ha provocado la disminución acelerada de un gran número de sus ejemplares en los países tropicales. Dentro de sus principales especies se encuentra la caoba (*Swietenia macrophylla* King). La alta variabilidad producida por la reproducción sexual en esta especie ha tenido como consecuencias la pérdida de características importantes como: velocidad de crecimiento, rectitud del fuste y resistencia a plagas y enfermedades (Grogan *et al.*, 2003).

La caoba es la especie maderable más importante comercialmente en el neotrópico, pero no se propaga a menudo con éxito debido a la baja eficiencia de los métodos de propagación convencionales. Se han realizado estudios donde se han evaluado diferentes

profundidades de siembra y diversas formas de preparación del suelo y los porcentajes de regeneración son inferiores al 49 % (Negreros-Castillo *et al.*, 2003).

En la rama forestal, la necesidad existente de multiplicar íntegramente individuos de caoba seleccionados ha despertado interés por los métodos de propagación vegetativa (Medina, 1995). Marquetti (1992) planteó que la propagación asexual con el empleo de técnicas convencionales (injertos, estacas y margullos) es posible; pero las plantas resultantes pierden rápidamente su valor comercial debido a múltiples ramificaciones causadas por efectos topofíticos. Aparentemente la vía más apropiada para la reproducción artificial de esta especie en cantidades comerciales es la micropropagación (Patiño, 1997).

El empleo de métodos biotecnológicos para lograr volúmenes considerables de plantas seleccionadas y poder establecer plantaciones mejoradas a corto plazo, es una alternativa que debe ser más explotada en estas especies. La micropropagación es uno de los más factibles de aplicar a corto plazo para el sector forestal, entre otras ventajas, permite lograr plantas con características genéticas similares a la que les dio origen (Rodríguez, 1999).

La mayor dificultad para el establecimiento de un protocolo de micropropagación radica en la edad del cultivo del cual se tomarán los explantes para el establecimiento *in vitro*, por ello es necesario realizar trabajos de rejuvenecimiento antes de su introducción. La caoba es una especie que ha sido muy poco trabajada mediante las técnicas de cultivo de tejidos, por ello no se encuentran muchas referencias sobre el tema. En Cuba se han realizado estudios por Rodríguez *et al.* (2003), pero no existe ninguna referencia sobre el establecimiento de esta especie a partir de ápices y segmentos nodales tomados de brotes epicórmicos pertenecientes a plantas adultas.

El cultivo *in vitro* es una herramienta bien justificada para la propagación y la conservación de especies recalcitrantes e individuos élites seleccionados. Por todo lo anteriormente expuesto se ha desarrollado este trabajo con el objetivo de lograr el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de caoba vía organogénesis a partir de plantas seleccionadas en campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron como material vegetal de partida ápices y segmentos nodales tomados de brotes cuya longitud osciló entre 7 y 15 cm, pertenecientes a una planta de caoba adulta ubicada en el Jardín Botánico de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Desinfección de los explantes

Para la desinfección del material vegetal fueron estudiadas dos concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl: 2.0 % y 3.0 %) combinadas con tres tiempos de exposición (10 y 30 min). Se evaluaron los porcentajes de explantes contaminados (%), explantes necrosados (%) y supervivencia (%).

Efecto de los reguladores del crecimiento en la fase de establecimiento

En la fase de establecimiento se utilizó el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS), al cual se le redujeron los nitratos a la mitad y se le adicionó tiamina 1.0 mg.l⁻¹, mioinositol 100 mg.l⁻¹ y sacarosa 2%, como gelificante se añadió gelrite al 2.0 %, en todos los casos el pH se ajustó a 5.8 previo a la esterilización.

Se estudiaron cinco concentraciones de 6-Bencilaminopurina (6-BAP): (0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 1.0 mg.l⁻¹) y se compararon con un control sin reguladores del crecimiento.

En todos los ensayos efectuados se utilizaron 40 réplicas por tratamiento y se colocó un explante por tubo de ensayo con 10 ml de medio de cultivo. Las evaluaciones se realizaron a los 28 días y se tuvieron en cuenta las variables porcentaje de explantes brotados (%) y longitud promedio del brote (cm).

Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico de SPSS versión 8.0 para Windows. Las diferencias entre las medias fueron determinadas mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan para el 5%. En las variables donde se midieron porcentajes se aplicó la prueba de análisis de proporciones o ANOVA sin réplicas (ANDEVAP).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección de los explantes

El tratamiento con NaClO al 3.0 % con un tiempo de exposición de los explantes durante 20 minutos mostró el valor máximo de supervivencia con diferencias significativas con los restantes y resultó ser de los mejores en cuanto al bajo porcentaje de explantes contaminados con microorganismos y necrosados, por lo que se definió este tratamiento como el más efectivo en la desinfección (Tabla 1).

Similares resultados obtuvo Villalobos (1992) en el cultivo del Lirio (*Eucharis amazonica*) con el uso de NaClO con concentraciones de 3.0 % y con un tiempo de exposición de 20 minutos.

En la literatura científica revisada no se han encontrado referencias sobre la utilización de NaClO en la desinfección de segmentos nodales y ápices de caoba.

Efecto de los reguladores del crecimiento en la fase de establecimiento

Los resultados mostraron un incremento en los valores de longitud de los brotes según disminuyó o se eliminó la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo (Tabla 2). Resultados similares fueron obtenidos cuando se utilizaron bajas concentraciones de 6-BAP (0.25 mg.l⁻¹) en el medio de cultivo para la elongación de brotes de caoba provenientes de semillas germinadas *in vitro* (Rodríguez *et al.*, 2003).

En cuanto al porcentaje de explantes brotados se manifestó un aumento de los valores y el tratamiento donde se utilizó 0.2 mg.l⁻¹ de 6-BAP presentó resultados significativamente superiores a las demás concentraciones (Tabla 2).

Tabla 1. Influencia del hipoclorito de sodio y el tiempo de desinfección en el establecimiento *in vitro* de explantes de caoba.

Tratamientos.	Explantos libres de contaminación microbiana (%).	Explantos necrosados (%).	Supervivencia (%).
NaClO 2% (10 min)	31.7 d	-	31.7 e
NaClO 2% (20 min)	50.0 c	-	50.0 d
NaClO 2% (30 min)	51.9 c	3.6 b	48.3 d
NaClO 3% (10 min)	63.8 b	1.8 a	62.0 c
NaClO 3% (20 min)	81.5 a	2.3 a	79.2 a
NaClO 3% (30 min)	82.9 a	12.8 c	70.1 b
± EE	± 0.73	±0.21	± 1.7
CV	2.17%	12.8%	2.19%

Medias con letras desiguales en una columna difieren estadísticamente según ANDEVAP ($p < 0.05$). EE – error estándar, CV- Coeficiente de variación.

Tabla 2. Efecto del 6-BAP sobre el porcentaje de explantes brotados y la longitud de los brotes en el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de caoba.

Concentraciones de 6-BAP ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	Explantos brotados (%)	Longitud del brote (cm)
0	3.1 e	1.7 a
0.1	34.2 c	1.7 a
0.2	63.9 a	1.5 a
0.3	61.3 a	0.8 b
0.5	59.2 a	0.5 c
1.0	46.0 b	0.2 d
± EE	± 1.0	± 0.08
CV	1.01%	15.78%

Medias con letras desiguales en una columna difieren estadísticamente según ANDEVAP ($p < 0.05$) y Según la prueba de rangos múltiples de Duncan para ($p < 0.05$). EE – error estándar, CV- Coeficiente de variación.

El comportamiento del crecimiento mostrado por los explantes en esta fase se fundamenta en lo planteado por Vásquez y Torres (1995). Según dichos autores para que ocurra adecuado balance endógeno de reguladores del crecimiento. Este balance es alcanzado de forma natural en la planta, sin embargo cuando se aíslan tejidos para multiplicarlos en condiciones artificiales, como ocurre en el cultivo *in vitro*, la acción exógena de reguladores del crecimiento es imprescindible. En este caso se observó que el 6-BAP incrementó el porcentaje de explantes brotados debido a su efecto sobre la división celular.

Tacoronte (1998) logró el desarrollo de yemas axilares en segmentos nodales de plantas de caoba germinadas *in vitro* en el medio de cultivo MS/2 con la utilización de BA (benciladenina), $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ y AIA (ácido indol acético), $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

El establecimiento de ápices y segmentos nodales de caoba tomados directamente de campo tiene gran importancia ya que por vez primera en se logró la fase inicial de una metodología para la propagación *in vitro* de esta especie.

CONCLUSIONES

Se logró el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de caoba vía organogénesis a partir de plantas seleccionadas en campo con el empleo de un medio de cultivo MS con los nitratos reducidos a la mitad, suplementado con $0.2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de 6-BAP.

REFERENCIAS

- Grogan, J, Ashton M y Galvao J (2003) Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) seedling survival and growth across a topographic gradient in southeast Pará, Brazil. *Forest Ecology and Management* 186: 311-326
- Negreros-Castillo, P, Snook L y Mize C (2003) Regenerating mahogany (*Swietenia macrophylla*) from seed in Quintana Roo, Mexico: the effects of sowing method and clearing treatment. *Forest Ecology and Management* 183: 351-362
- Patiño, F (1997) Recursos genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los neotrópicos: Propuesta para acciones coordinadas. FAO.Roma.
- Rodríguez, R (1999) Bases fisiológicas del envejecimiento y revigorización vegetal. Libro de reportes cortos. En: IV Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. pp. 9-13

- Rodríguez, R, Daquinta M, Capote I, Pina D, Lescano Y y González-Olmedo J (2003) Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahagani* (Caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (cedro). Cultivos Tropicales 24: 23-27
- Tacoronte, B (1998) Cultivo *in vitro*. Una alternativa de propagación vegetativa en caoba, *Swietenia macrophylla* King. Revista Forestal Venezolana 42 (1): 235-238
- Vázquez, E y Torres, S (1995) Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación. Segunda edición. Ciudad de la Habana
- Villalobos, A (1992) Micropropagation of selected root crop, Lirio (*Eucharis amazonica*). Tissue cultural applied to ornamental species. 9: 155-164