

AVANCES EN EL CULTIVO DE TEJIDOS DE *SWIETENIA MACROPHYLLA* KING. X *SWIETENIA MAHOGANI* JACQ. (HÍBRIDO DE CAOBA)

Ms. C. LUCÍA MARIBEL MEDINA MALAGÓN Y DR. ROGELIO SOTOLONGO SOOSPEDRA

Universidad de Pinar del Río. Calle Martí 270 Final, Pinar del Río,
lucia@af.upr.edu.cu / soto@af.upr.edu.cu.

RESUMEN

La propagación de clones de especies forestales se ha considerado como un método alternativo esencial en su proceso de recuperación. El cultivo de tejidos en las caobas puede contribuir significativamente a la propagación a gran escala, donde la embriogénesis somática constituiría un aporte importante para esta especie tan recalcitrante a estas técnicas por lo difícil de sus respuestas morfogénicas y los altos porcentajes de fenolización y contaminación endógenos, además de que la vía tradicionalmente usada para su propagación no garantiza su pureza genética. A tal efecto se utilizaron explantes, procedentes en su totalidad de árboles selectos donde se obtuvieron altos porcentajes de establecimiento, sobre todo en los procedentes de rebrotes de estacas. El alto porcentaje de callos obtenidos, el manejo adecuado de los medios de cultivo, así como los estudios macromorfológicos e histológicos realizados permiten aseverar que se indujeron estructuras proembrionales como premisa en la obtención de embriogénesis somática.

Palabras clave: *Meliáceas, cultivo in vitro, embriogénesis somática, callogénesis, propagación clonal.*

INTRODUCCIÓN

En el proceso de recuperación de las caobas el cultivo de tejidos puede contribuir significativamente

ABSTRACT

The propagation of clones of forest species has been considered as an essential alternative method, in the process of recovery of the same ones. The cultivation of fabrics in the mahoganies can contribute significantly to the propagation to great scale where the somatic embryogenesis would constitute an important contribution for this species so recalcitrant to these techniques for the difficult of its answers morphogenetic and the high fenolization percentages and endogenous contamination besides that the way traditionally used for its propagation it doesn't guarantee its genetic purity. To such an effect explants was used, reasonable in its entirety, of select trees where high establishment percentages were obtained mainly in those coming from rebrotes of stakes. The high percentage of obtained tripes, the appropriate handling of the cultivation means, as well as the studies macromorphological and carried out histological allow to assert that structures proembrionales was induced, as premise in the obtaining of somatic embryogenesis.

Key words: *Meliaceae, cultivation in vitro, somatic embryogenesis, callogenesis, clonal propagation.*

en la propagación a gran escala y la conservación de clones seleccionados.

En el caso de especies del género *Swietenia* existen varios reportes de regeneración de plantas a partir del cultivo *in vitro* [Venkestewaran y col., 1987; Lee y Rao, 1988; Maruyama y col. 1989; Sotolongo y Medina, 2002]; pero al igual que la mayoría de los reportes de micropropagación los resultados han sido a partir de plantas asépticas.

La definición de un protocolo de micropropagación del híbrido a través de embriogénesis somática sería muy conveniente teniendo en cuenta las ventajas de esta vía [Haines y Martín, 1997]. Maruyama e Ishii (1999) obtuvieron embriogénesis somática en la especie *Swietenia macrophylla* King a partir de plantas asépticas. Peña y Lezcano (2001), así como Sotolongo y Medina (2002), reportan la formación de callos a partir de meristemas apicales y hojas sin lograr inducir embriogénesis somática.

Teniendo en cuenta la posibilidad que ofrece esta vía para lograr propagar clonalmente el híbrido de caoba, se realizó este trabajo, donde se logró inducir la formación de estructuras proembrionales en callos, obtenidos a partir de explantes foliares de árboles adultos de *Swietenia macrophylla* King x *Swietenia mahagoni* Jacq., como vía para la propagación masiva de esta especie y la obtención de poblaciones puras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Como fuente de explantes fueron utilizados árboles híbridos (*Swietenia macrophylla* King x *Swietenia*

mahagoni (L.) Jacq.) de 11 años de edad, los cuales se obtuvieron por injerto sobre un patrón de *Swietenia macrophylla* King. De este se tomaron ramas leñosas, las que al ser puestas en agua emitieron rebrotes, de los cuales sus foliolos y yemas sirvieron como explantes.

Inducción de embriogénesis somática

Medios de cultivos empleados para la inducción calogénica

Diseño de los experimentos

1. MEDIO BASE

Sales del MS, vitaminas gamborg 25 mg/L, cisteína 25 mg/L, sacarosa 30 g/L.

Variantes hormonales A1, A3, A6, A7, A8, A9, A10, A11, a12, A13, A14.

BAP (0, 1, 4, 6, 0,5) mg/L

ANA (2, 4, 8,12, 16) mg/L

2. MEDIO BASE

½ de las sales del MS, vitaminas gamborg 25 mg/L, caseína hidrolizada 100 mg/L., cisteína 25 mg/L., sacarosa 30 mg/L.

Variantes hormonales C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14.

2,4D (0,5-1 mg/L), AIB (0,5-2 mg/L), KIN 2 mg/L, agua de coco 50 y 100 mg/L, inositol 100 mg/L

3. MEDIO BASE

Sales del MS, vitaminas gamborg 25 mg/L, agua de coco 100 mg/L, sacarosa 30 g/L

Variantes hormonales D1, D2.

BAP (0-1 mg/L)

4. MEDIO BASE

½ de las sales del MS, vitaminas gamborg 25mg/L + inositol 100 mg/L, caseína hidrolizada 200 mg/L, cisteína 25 mg/L, sacarosa 30 g/L.

Variantes hormonales E1, E2, E3, E4. 2,4 D (0,5 y 1mg/L), AIB (0,5-1 mg/L), KIN 2 mg/L.

Los experimentos fueron evaluados a los siete días de inoculados los explantes, y se tuvo en cuenta porcentaje de explantes contaminados con hongos (Ch) y/o bacterias (Cb), porcentaje de explantes fenolizados (Nf) y porcentaje de explantes establicidos (Ne).

Se tuvo en cuenta además caracteres cualitativos de los callos obtenidos en todas las variantes de medios de cultivo y de reguladores del crecimiento empleados.

Trasplante de callos

Los callos obtenidos en los medios A9, A10 se trasplantaron a AT1 (4y 6 mg/L BAP), AT2 (0,1 mg/L ANA).

Los callos obtenidos en los medios A1 y A8 se trasplantaron a las siguientes variantes:

Variantes hormonales BT1 / (A8), BT2 / (A8), BT3 (A8), BT4 / (A8), BT5 / (A1), BT6 / (A1), BT7 / (A1), BT8 / (A1).

Variantes hormonales 2,4-D (0,5-1 mg/L), AIB (0,5-1 mg/L), KIN (2 mg/L).

Un tercer trasplante se realizó a los callos previamente desarrollados en las variantes A1, A8, A11, A12, A13, A14 para los medios siguientes:

CT1 / A1, CT2 / A3, CT3 /A8, CT4 / A1, CT5 / A8, CT6 / A11, CT7 / A11,

CT8 / A12, CT9 / A12, CT10 / A13, CT11 / A13, CT12 / A14, CT13 / A14

Variantes hormonales BAP (4 y 6 mg/L) ANA (0,1 mg/L).

Un cuarto trasplante se realizó desde las variantes A1 y A8 a las siguientes variantes:

MEDIO BASE

½ de las sales del MS, agua de coco 100 mL/L.

Variantes hormonales DT1 /A1, DT2 /A8, DT3 /A8, DT4 /A1.

2,4-D (1 y 2mg/L), AIB (1 mg/L), KIN (2 mg/L)

Un quinto trasplante se realizó a partir de C11, C12, C13 para las variantes compuestas por:

MEDIO BASE

½ WPM

Variantes hormonales W1 / C11,W2 / C11,W3 / C11, W4 / C12,W5 / C12, W6 / C12, W7 / C13, W8 / C13, W9 / C1

BAP (0,1 y 0,2 mg/L).

En todas las variantes se empleó como solidificante phytagel 0,2 % p/v, y el pH se ajustó a 5,8 utilizando para ello hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl).

Análisis histológicos

Se realizaron cortes histológicos a los callos obtenidos en las diferentes variantes empleadas. Se describieron los tejidos observados en el microscopio y se realizó su análisis.

Análisis biométrico

Para el análisis de los datos obtenidos a partir de los experimentos se

empleó el paquete estadístico SPSS 10.0 para Windows, versión 6.0.

Se aplicó un análisis factorial con el objetivo de comprobar la contribución de las variables evaluadas a los resultados de los experimentos. El análisis factorial intenta identificar variables subyacentes o factores que expliquen la configuración de las correlaciones dentro de un conjunto de variables observadas.

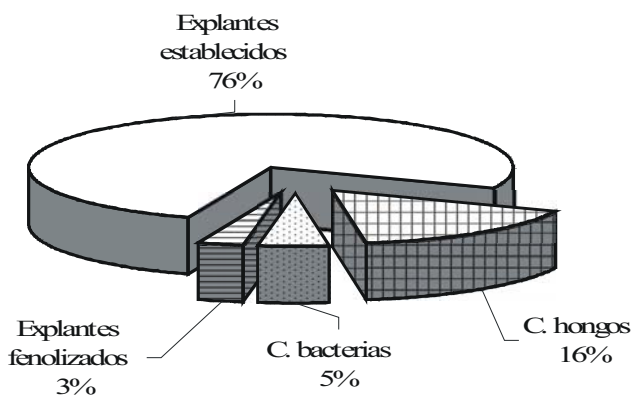
El análisis de conglomerados jerárquicos se aplicó con el fin de poder agrupar las diferentes respuestas a la calogénesis y su relación con los diferentes medios de cultivo empleados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de estructuras proembrionales a partir de callos

Resultados del establecimiento in vitro. Obtención del explante

La utilización de rebrotes como fuente de explante para el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de *Swietenia macrophylla* King x *Swietenie mahagoni* (L.) Jacq., resultó muy efectivo, ya que se pudo contar permanentemente con material vegetal para llevar a cabo los experimentos (Fig. 1).



Resultados diferentes obtuvieron otros autores al disminuir la concentración de hipoclorito y aumentar el intervalo de tiempo en la inmersión. Esta variante fue utilizada por Murayama y col. (1999) en la desinfección de semillas de King con hipoclorito de sodio al 1% por 15 min. También Moon y col. (1999), al desinfectar yemas invernales de 10 años de edad de *Aralia elata*, con (NaOCl) al 2% durante 30 min, obtuvieron muy buenos resultados.

Respuesta a la calogénesis

Análisis factorial

Se seleccionaron tres componentes que explican el 87% de la varianza total, válido teniendo en cuenta que se trata de experimentos de carácter biológico. El análisis de las comunales arrojó que todas las variables contribuyeron significativamente al análisis realizado con coeficientes mayores de 0,5 en todos los casos (Tabla 1).

TABLA 1
Comunalidades

<i>Variable</i>	<i>Extracción</i>
Consistencia del callo	0,811
Color	0,963
Estructura al microscopio	0,815
Formación de estructuras histológicas	0,833
Lugar de formación	0,912

Método de extracción: análisis de componentes principales.

A través de la matriz de componentes rotados (*Tabla 2*) se comprobó que las variables que describen la formación de estructuras histológicas, las

características al microscopio de los tejidos formados y la consistencia del callo están íntimamente correlacionadas.

TABLA 2
Matriz de componentes rotados (se destacan en cursiva las variables por componente)

<i>Variable</i>	<i>Componente</i>		
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Consistencia del callo	0,898	-5,687E-02	-3,641 E-02
Formación de estructuras	0,859	-0,258	-0,170
Estructura al microscopio	0,742	0,464	0,220
Lugar de formación	-2,540E-02	0,939	-0,175
Color	-4,648E-03	-0,138	0,972

Método de extracción: análisis de componentes principales.

Método de rotación: normalización Varimax con Kaiser.

Análisis de conglomerados

De acuerdo con el dendrograma obtenido del análisis conglomerado, las respuestas a la callogénesis en cada una de las variantes de medios de cultivo empleados se pudieron clasificar en cinco grupos.

Grupo 1: C14, C15, C12, D2, C10, C11. Formación de callos de naturaleza compacta y de coloración gris oscuro hasta pardo, estructuras histológicas de color pardo.

Grupo 2: C8, D1, A1, C7. Formación de callos pardos oscuros sobre todo el explante, células parenquimáticas alargadas.

Grupo 3: C8, D1, A1, C7, C3, C4, A9, C1, C13, E1, E4, C2, E2. Mejor respuesta morfogénica. Callos blancos, friables. Estructuras histológicas blancas sobre el explante. Células meristemáticas y tráqueas en determinadas zonas.

Grupo 4: A11, E3, C5, C6, A10, C9. Callos friables, gris claro. Células

parénquimáticas con paredes celulares primarias, citoplasma vacuolizado y núcleo desplazado a la periferia.

Grupo 5: A3, A8, A13, A14, A12. Callos con coloración verde oscuro. No mostraron índices de posible morfogénesis.

De acuerdo con los resultados, la utilización de las sales descritas por Murashige y Skoog (1962) reducidas a la mitad de su concentración es donde se desarrollan callos con mejores características desde el punto de vista morfológico. Resultado similar obtuvieron Augustine y col. (1999) al utilizar el mismo medio para la inducción y proliferación de embriones somáticos en la especie *Gnetum*.

Como se puede apreciar, en las descripciones anteriores los mejores resultados en cuanto a la inducción de callos a partir de folíolos de rebrotes de este híbrido de caoba se obtuvieron cuando se combinó en el medio de cultivo los reguladores del crecimiento 2,4-D, AIB y kinetina. En estas variantes se lograron callos que por sus características macromor-

fológicas y citológicas fueron los más promisorios de una posible embriogénesis somática.

En cuanto al empleo de la kinetina como regulador del crecimiento, Muralidharan & Mascarenhas (1995) plantean que cuando fue utilizada en el medio de cultivo se incrementó el tamaño de los embriones y fueron más alargados en *Corymbia citriodora*.

El efecto del agua de coco en la inducción calogénica no fue favorable. Este resultado contrasta con lo obtenido por Viana y col. (1999), quienes propiciaron la mejor inducción de callos embriogénicos con la adición de 100 mL de agua de coco en el medio de cultivo, al cultivar embriones cigóticos maduros de *Ocotea catharinensis*.

Efectos del trasplante

Análisis factorial

Se seleccionaron, al igual que en el epígrafe anterior, tres componentes que explicaron el 84% de la varianza total. El análisis de las comunales demostró que todas las variables contribuyeron significativamente (Tabla 3).

TABLA 3
Comunalidades

<i>Variable</i>	<i>Extracción</i>
Consistencia	0,789
Color	0,752
Estructura al microscopio	0,910
Formación de estructuras histológicas	0,834
Lugar de formación	0,923

Método de extracción: análisis de componentes principales.

TABLA 4

Matriz de componentes rotados (se destacan en cursiva las variables por componentes)

<i>Variable</i>	<i>Componente</i>		
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Formación de estructuras	0,888	-4,708 E-03	0,215
Consistencia	-0,871	-0,158	-6,960 E-02
Estructura al microscopio	1,739 E-02	0,954	9,947 E-03
Color	0,201	0,702	-0,468
Lugar de formación	0,293	-0,116	0,908

Método de extracción: análisis de componentes principales.

Método de rotación: Normalización Varimax con Kaiser.

La matriz de componentes rotados (Tabla 4) muestra que las variables consistencia del callo, formación de estructuras y color, y estructuras al microscopio están altamente correlacionadas. En el primer caso, como en los experimentos para inducir la callogénesis, los callos más friables rara vez forman estructuras.

Análisis de conglomerados

A partir del dendrograma se definieron ocho grupos o respuestas de acuerdo con el medio de cultivo empleado para el trasplante.

Grupo 1: W4, W9, W8, CT8, DT2. Callos con tejidos blancos y pardos, células meristemáticas, isodiamétricas, núcleo central y poco vacuolizadas.

Grupo 2: CT1, CT9, CT10. Callos color gris claro. Desarrollo de estructuras blancas sobre el callo.

Grupo 3: W1, W3, W5, W6, W7, DT3. Color más oscuro de todos los grupos de callos. No formación de estructuras histológicas sobre el callo.

Grupo 4: At1, At2, Bt3. Callos de colores claros, consistencia compacta,

formación de tejidos blancos sobre el callo.

Grupo 5: Bt2, Bt4, Bt5, Bt7, Bt8, Ct2, Ct6. Callos de color gris claro, consistencia acuosa, células parenquimáticas.

Grupo 6: Dt4, W2. Características similares al grupo anterior.

Grupo 7: Ct7, Dt1, Ct4, Bt6, Ct5, Bt1. Callos de color gris claro, consistencia friable, estructuras gris claro acuosas, células parenquimáticas.

Grupo 8: Ct3. Presencia de rizogénesis sobre el callo. Callos color verde claro, friables.

En la última variante, al igual que en la fase de inducción calogénica, la combinación de 2,4 D, AIB y kine-tina favorecieron un desarrollo citológico que coincide con las descripciones de Jasik y col. (1994) de callos embriogénicos obtenidos a partir de megametofitos de la especie *Pinus nigra* Arn.

Resultó positivo para la inducción y mantenimiento de los callos en todos los casos la presencia en los medios de cultivo de aditivos orgánicos como

la caseína hidrolizada en proporciones de 200 y 250 mg/L. Augustine y col. (1999) plantean que sin la presencia de caseína hidrolizada en el medio de cultivo no fue posible el mantenimiento y proliferación de callos embriogénicos en *Genetumula*.

Un efecto diferente provocó la adición al medio de cultivo de agua de coco en el trasplante de los callos. A diferencia de la fase de formación, la adición de esta sustancia favoreció la proliferación de los callos trasplantados.

BIBLIOGRAFÍA

- AUGUSTINE: «Somatic Embryogenesis of *Gentumula*», *Tree Improvement*, Science Publishers, Editor Sunil Puri, Estados Unidos, 1999.
- GAMBORG, O. L.: «Plant Cell Culture: Nutrition and Media», *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant*, California, Estados Unidos, 1984.
- HAINES, R. J.; B. E. MARTIN: «Biotechnology and the Sustainable Production of Tropical Timber», *Forest Genetic Resources*, FAO (25), 1997.
- JASIK, J.; T. SALAJOVA; J. SALAJ: *Developmental Anatomy and Ultrastructure of Early Somatic Embryos in European Black Pine (Pinus nigra Arn.)*, Ed. Springer-Verlag, Austria, 1994.
- MASCARENHAS, A. M.; A. F. MURALIDHARAN: «Tissue culture of forest trees», *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, *Plant Science Letters*, 18:166-189, 1995.
- MOON, H. K.; Y. YOUNG: «Somatic Embryogenesis from Winter Buds of 10-Year-Old *Aralia elata*», *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 5, Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, 1999, pp. 45-63.
- MURASHIGE, T.; F. SKOOG: «Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures», *Physiol. Plant* 15:473-497, 1962.
- MURAYAMA, E.; K. ISHII: «Somatic Embryogenesis in Big-Leaf Mahogany (*Swietenia macrophylla* King)», *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol. 5, Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, 1999, pp. 45-63.
- PEÑA OROZCO, J. Y.; A. J. LEZCANO ROMERO: *Cultivo in vitro de Swietenia macrophylla King x Swietenia mahogani* Jacq. 54h», Trabajo de diploma en opción al título de ingeniero forestal, Universidad de Pinar del Río Hermanos Saiz Montes de Oca, Cuba, 2001.
- SOTOLONGO, R.; L. M. MEDINA: «Callogénesis *in vitro* del híbrido de caoba (*S. macrophylla* x *S. mahogani*)», Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 98, La Habana, 1998.
- Statistical Package for Social Science para Windows, versión 10, 1999 (SPSS).
- VIANA, A.M.; S. H. MANTELL: «Somatic Embryogenesis of *Ocotea catharinensis*: an Endangered Trees of the *Mata atlantica*», *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 5, Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, 1999, pp. 3-31.