

Efecto de sorbitol y 6-BAP en la maduración y germinación de embriones somáticos *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq

Raúl Barbón^{1*}, Iván Borroto, Mariana la O, Elisa Quiala, Marta Pérez. *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: raulb@ibp.co.cu

RESUMEN

Los bajos porcentajes de germinación de los embriones somáticos en *S. mahagoni* constituyen una problemática a resolver y se plantea que la causa está en el bajo nivel de maduración. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de diferentes concentraciones de sorbitol y 6-BAP en la maduración de embriones somáticos *S. mahagoni* para incrementar el porcentaje de germinación. Se colocaron embriones somáticos en etapa cotiledonal en un medio de cultivo de maduración. Se emplearon tres concentraciones de sorbitol (20.0, 40.0 y 60.0 g l⁻¹) y se evaluó la maduración de los embriones somáticos mediante su respuesta en el medio de cultivo de germinación. Se demostró que el cultivo de embriones somáticos en un medio de cultivo para la maduración con 40 y 60 g l⁻¹ de sorbitol combinado con 6-BAP (0.25 mg l⁻¹) es necesario para incrementar el número de embriones somáticos germinados en la especie *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.

Palabras clave: embriones secundarios, embriogénesis somática, hiperhidricidad, osmóticos.

Effect of sorbitol and 6-BAP in *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. somatic embryos maturation and germination

ABSTRACT

Low germination of somatic embryos in *S. mahagoni* is a problem that needs solutions. Its cause is related to the low level of embryo maturation. The objective of this research was to determine the effect of different concentrations of sorbitol and 6-BAP in the maturation of somatic embryos of *S. mahagoni* to increase the percentage of germination. Somatic embryos in cotyledonary stage were placed in maturation medium. Three concentrations of sorbitol (20.0, 40.0 and 60.0 g l⁻¹) were used and the maturation of the embryos was assessed by their response to the germination medium. It was shown that somatic embryos growing in a culture medium for the maturation with sorbitol 40 and 60 g l⁻¹ in combination with 6-BAP (0.25 mg l⁻¹) is necessary to increase the number of somatic embryos germinated in *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.

Key words: hyperhydricity, osmotic, secondary embryos, somatic embryogenesis.

INTRODUCCION

Una de las especies maderables más valiosas del mundo es *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq., la cual pertenece a la familia *Meliaceae*. Se conoce con los nombres comunes de caoba, caoba antillana o caoba de Cuba (Betancourt, 1999). Es una especie forestal muy cotizada por su madera, pero se encuentra amenazada por las deforestaciones indiscriminadas y por el ataque severo de un insecto, conocido como el barrenador de las meliáceas *Hypsipyla grandella* Zell (Lepidoptera, Pyralidae), además presenta una baja capacidad de regeneración. Es por ello que ha sido incluida en el apéndice II de CITES como especie amenazada. Es necesario el establecimiento y desarrollo de métodos de propagación eficientes y dinámicos que le

solución a la necesidad de este recurso renovable y minimicen la presión de deforestación sobre los ecosistemas naturales (Álvarez, 2000).

La propagación vegetativa representa una vía más directa para mantener características genéticas de un árbol élite. Dentro de este tipo de propagación, el cultivo de tejidos ofrece un gran potencial de apoyo a los métodos tradicionales, al incrementar la producción de variedades genéticamente superiores, provenientes de la selección de poblaciones, del mejoramiento genético convencional o de un número limitado de semillas de polinización controlada (Altman y Loberant, 1998).

La embriogénesis somática ha devenido como el proceso morfogénico preferido para la

regeneración de árboles ya que permite el desarrollo de plantas completas a partir de células individuales, el mantenimiento de la identidad clonal y se evitan fenómenos no deseados como las quimeras (Poupin y Arce-Johnson, 2005). Además, ofrece tasas potencialmente altas de propagación, así como potencial escalado, transferencia a sistemas de biorreactores, tecnologías de semilla sintética y el hecho de que los cultivos embriogénicos son susceptibles a ser tejidos blancos para la transferencia génica (Ducos *et al.*, 2007).

Sin embargo, pocos trabajos se han realizado en relación con la embriogénesis somática en el género *Swietenia* (Collado *et al.*, 2005; Borroto, 2008). Los bajos porcentajes de germinación constituyen una problemática a resolver y se plantea que la causa está en la pobre maduración que poseen los embriones somáticos, evidenciado por el bajo nivel de histodiferenciación. Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado se propuso como objetivo de este trabajo determinar el efecto de sorbitol y 6-Bencilaminopurina (6-BAP) en la maduración y germinación de embriones somáticos de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon embriones somáticos de *S. mahagoni* en etapa de cotiledonal obtenidos en medios de cultivo semisólidos mediante la metodología descrita por Borroto (2008).

Maduración de los embriones

Con el objetivo de incrementar el porcentaje de germinación de los embriones somáticos mediante una mayor maduración se realizó un ensayo donde se incluyeron diferentes concentraciones de sorbitol y combinado con 6-BAP.

Se colocaron embriones somáticos en etapa cotiledonal en un medio de cultivo de maduración, el cual estaba constituido por la mitad de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), 500 mg l⁻¹ de L-glutamina, 30.0 g l⁻¹ sacarosa y 2.5 g l⁻¹ de Gelrite (SIGMA). Cada tratamiento contó con ocho réplicas y cinco embriones somáticos por frasco de cultivo. Se estudiaron tres concentraciones de sorbitol

(20.0, 40.0 y 60.0 g l⁻¹) y su combinación con 6-BAP (0.25 mg l⁻¹). A los 30 días de cultivo, se colocaron los embriones somáticos en un medio de cultivo de germinación constituido por la mitad de las sales MS, vitaminas MS 10 ml l⁻¹, 0.25 mg l⁻¹ de 6-BAP y 20.0 g l⁻¹ de sacarosa.

La maduración de los embriones somáticos se evaluó mediante su respuesta en el medio de cultivo de germinación a los 30 días de cultivo mediante las siguientes variables por frasco de cultivo:

- Número de embriones somáticos con germinación total,
- Número de embriones somáticos con germinación parcial,
- Número de embriones somáticos con síntomas de hiperhidricidad,
- Número de embriones somáticos con presencia de embriogénesis somática secundaria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron un incremento significativo del número de embriones somáticos con germinación total y parcial procedentes de tratamientos de maduración donde se incluyó sorbitol (20 y 40 g l⁻¹) combinado con 6-BAP (Tabla 1 y Figura 1).

Se demostró que el cultivo de embriones somáticos de *S. mahagoni* en un medio de cultivo para la maduración con 40 y 60 g l⁻¹ de sorbitol es necesario para incrementar el número de embriones somáticos germinados. Esto unido a la combinación con 6-BAP demostró que su adición al medio de cultivo incrementa significativamente los porcentajes de germinación completa y parcial de los embriones somáticos de esta especie.

Autores como Collado *et al.* (2007) obtuvieron resultados similares a los presentados pero en la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* con sacarosa como agente osmótico en el medio de cultivo. Estos autores estudiaron un rango de un 2.0 - 8.0%, y obtuvieron el mejor resultado con un 6.0% de sacarosa. De igual forma, García *et al.* (2001) señalaron que el empleo de manitol en la fase de maduración produjo una respuesta similar a cuando se utilizó sacarosa para la germinación de embriones somáticos de la especie *Olea europea* L.

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en la germinación de embriones somáticos de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.

Tratamientos	Germinación completa	Germinación parcial
	No.ES/frasco	No.ES/frasco
Control (0.25 mg l ⁻¹ 6-BAP)	1.0 c	1.1 d
20 g l ⁻¹ Sorbitol + 0.25 mg l ⁻¹ 6-BAP	0.8 c	1.2 c
40 g l ⁻¹ Sorbitol + 0.25 mg l ⁻¹ 6-BAP	3.6 a	2.7 a
60 g l ⁻¹ Sorbitol + 0.25 mg l ⁻¹ 6-BAP	3.4 a	3.0 a
20 g l ⁻¹ Sorbitol	1.0 c	0.9 d
40 g l ⁻¹ Sorbitol	1.9 b	2.0 b
60 g l ⁻¹ Sorbitol	2.3 b	2.1 b

Medias con letras no comunes en cada columna difieren significativamente según prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para $p < 0.05$.



Figura 1. Embriones somáticos de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. con germinación completa y parcial a los 30 días de cultivo en medio de cultivo de germinación.

Otros autores han informado la adición de 6-BAP en el medio de cultivo para la germinación de embriones somáticos. Por ejemplo, Vilchez (2001) refirió que con el empleo de 6-BAP combinado con un análogo del brasinoesteroides (Biobras 6) en concentraciones de 0.25 mg l⁻¹ y 10.0 mg l⁻¹, respectivamente y condiciones de luz solar, lograron un 82.0% de germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. Sin embargo, Collado *et al.* (2005) señalaron que para *S. macrophylla* un aumento de las concentraciones de 6-BAP en el medio de cultivo afectó negativamente la germinación de los embriones somáticos y sus mejores resultados los obtuvieron en un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento. Con este mismo regulador del crecimiento (0.44 μM) Capuana *et al.* (2007) lograron una mejor germinación de embriones somáticos con

emisión del hipocótilo y abertura completa de los cotiledones en *Fraxinus excelsior* (L.).

En cuanto a la expresión de síntomas de hiperhidricidad, el tratamiento con 0.25 mg l⁻¹ de 6-BAP mostró diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 2). Por ello, se podría que la maduración de los embriones somáticos previo a la germinación los hace menos susceptibles a manifestar síntomas de hiperhidricidad.

Con respecto a la embriogénesis secundaria el mayor valor se presentó en el tratamiento con 0.25 mg l⁻¹ de 6-BAP (Tabla 2 y Figura 2). Por otra parte, un menor número de embriones somáticos con embriogénesis secundaria, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos, se observó en los embriones somáticos madurados con 40 y 60 g l⁻¹ de sorbitol en el medio de cultivo.

Tabla 2. Efecto de sorbitol y 6-BAP en la expresión de síntomas de hiperhidricidad y la embriogénesis secundaria de embriones somáticos de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. a los 30 días de cultivo.

Tratamientos	Hiperhidricidad	Embriogénesis secundaria
	No.ES/frasco	No.ES/frasco
Control (0.25 mg l ⁻¹ 6-BAP)	4.0 a	1.5 a
20 g l ⁻¹ Sorbitol + 0.25 mg l ⁻¹ 6-BAP	2.6 b	0.4 b
40 g l ⁻¹ Sorbitol + 0.25 mg l ⁻¹ 6-BAP	1.3 c	0.4 b
60 g l ⁻¹ Sorbitol + 0.25 mg l ⁻¹ 6-BAP	1.3 c	0.2 bc
20 g l ⁻¹ Sorbitol	1.4 c	0.3 bc
40 g l ⁻¹ Sorbitol	0.4 c	0.1 c
60 g l ⁻¹ Sorbitol	0.2 c	0.1 c

Medias con letras no comunes en cada columna difieren significativamente según prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para $p < 0.05$.



Figura 2. Embriones somáticos de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq germinados y con embriogénesis somática secundaria a los 30 días de cultivo.

Estos resultados demostraron que los embriones somáticos madurados con altas concentraciones de sorbitol en el medio de cultivo alcanzaron etapas superiores de desarrollo y que la adición de 6-BAP al medio de cultivo incrementó la presencia de embriogénesis secundaria.

Un comportamiento similar fue informado para la especie leñosa *Quercus robur* L. (Cuenca *et al.*, 1999; Zegzouti *et al.*, 2001), donde con el aumento del estado de madurez de los embriones somáticos, hubo una disminución de la embriogénesis somática secundaria. De igual forma, se obtuvieron en la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* (Collado *et al.*, 2007), donde los menores valores embriogénesis secundaria lo manifestaron embriones somáticos con maduración previa a la

germinación en medio de cultivo con 6.0 y 8.0% de sacarosa.

CONCLUSIONES

Se demostró que el cultivo de embriones somáticos de *S. mahagoni* en un medio de cultivo para la maduración con 40 y 60 g l⁻¹ de sorbitol y 6-BAP es necesario para incrementar el número de embriones somáticos germinados en la especie *Swietenia mahagoni*.

REFERENCIAS

- Álvarez, A (2000) La Genética Forestal en Cuba: Avances del siglo XX y desafíos del siglo XXI. Recursos genéticos forestales 27:18-28
- Atman, A, Loberant B (1998) Micropropagation. Clonal plant propagation *in vitro*. Agricultural Biotechnology 8:19-42

- Betancourt, A (1999) Silvicultura especial de árboles maderables. Editorial Científico-Técnica. La Habana
- Borroto, IR (2008) Embriogénesis somática de *Swietenia mahogany* (L.) Jacq. en medios de cultivo semisólidos. Tesis presentada en opción al título académico de *Magister Scientiae* en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Villa Clara, Cuba 54 pp
- Capuana, M, Petrini G, Di Marco A, Giannini R (2007) Plant regeneration of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) by somatic embryogenesis. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 43:101-110
- Collado, RL, Barbón, R, Agramonte D, Jiménez-Terry F, Pérez m, Gutiérrez O (2005) Germinación de embriones somáticos de *Swietenia microphylla* en medios de cultivo semisólido. *Biotecnología vegetal* 5(1):17-21
- Collado, RL, Barbón R, Agramonte D, Jiménez-Terry F, Pérez M, Gutiérrez O, La O M (2007) Efecto de la deshidratación y la sacarosa en la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King. *Biotecnología vegetal* 7(1):35-39
- 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
- García, JL, Troncoso J, Sarmiento R, Troncoso A (2001) Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explant raised from them. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69:95-100
- Ducos, JP, Lambot C, Pétiard V (2007) Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. *International Journal of Plant Developmental Biology* 1(1): 1-12
- Poupin, MJ, Arce-Johnson P (2005) Transgenic tress for a New Era. *In vitro* Cell Dev. 41:91-101
- Vilchez, J (2001) Embriogénesis somática y regeneración de plantas de guayabo (*Psidium guajaba* L.) Tesis presentada en opción al título académico de *Magister Scientiae* en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Villa Clara, Cuba 60 pp
- 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

Recibido: 17-10-2012

Aceptado: 23-11-2012