

Proliferación celular de tejidos foliares de caoba *Swietenia macrophylla* King, cultivados *in vitro*

Cellular proliferation of leaf tissues of mahogany *Swietenia macrophylla* King, cultured *in vitro*

Melangel Tacoronte*, María Vielma*, Carle Valecillos y Argenis Mora**

*Indeфор. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes Mérida-5101 Venezuela.

e-mail tacoront@forest.ula.ve / mvielma1@ciencias.ula.ve

**Laboratorio de cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología

Resumen

Discos foliares de caoba de 0,5 cm de diámetro con y sin nervadura central, fueron cultivados en un medio MS a la mitad de su fuerza iónica, modificado y complementado con concentraciones de auxina y citoquinina (ANA/BA), determinadas por el diseño estadístico "Compuesto Central Rotable" (CCR). Las condiciones de incubación fueron inicialmente oscuridad total por dos semanas y luego exposición a fotoperíodo de 16 h de luz y 1.675 lux, a 25°C. En general, los discos foliares con nervadura central presentaron una mayor capacidad de respuesta en cuanto a la formación de callos, alcanzando hasta un 73,3 % al aplicarse 1,5 mg/L de ANA. Siguiendo la metodología del diseño CCR los resultados se muestran conformando una superficie de respuesta, en la cual se observa una óptima relación auxina/citoquinina, 1,63/1 mg/L, la cual estimula una máxima formación de callo, paso inicial para abrir posibilidades de propagación, bien sea, vía embriogénesis u organogénesis indirecta.

Palabras clave: *Swietenia macrophylla* discos foliares, callos, ANA, BA.

Introducción

Muchas especies de gran valor maderable, como *Swietenia macrophylla* King, se encuentran en peligro de extinción, atribuible básicamente al incumplimiento e inexistencia de políticas de manejo del bosque tropical; consecuentemente perspectivas conservacionistas y económicas no son compatibles quedando desabastecida la demanda del recurso. Pellew (1996), afirma que "la

Abstract

Mahogany leaf disks of 0.5 cm diameter with and without central nerve were cultured on a half-strength MS medium, modified and supplemented with different combinations of auxin and cytokinin (ANA/BA) determined by the Central Compositional Rotable Design Method (CCR). Initially, incubation condition were: total darkness during two weeks, followed by a 16-h photoperiod, at 25°C. Most of the central nerve of the leaf discs showed a higher percent response of callus formation, and in this case, the better treatment proved to be 1.5mg/l ANA, 73.3%. Results analysed by the C.C.R. Design Method gave a response surface showing an optimal relation of 1.63 / 1 mg/l auxin/cytokinin, which stimulates maximum callus formation. This opens up new possibilities for propagation via embryogenesis or indirect organogenesis.

Key words: *Swietenia macrophylla* King, Mahogany, leaf discs, CCR Design Method.

biodiversidad es el barómetro para indicar en qué medida estamos desempeñándonos para el logro del desarrollo sostenible".

Ante tal situación del manejo del bosque (Vincent 1995), señala el establecimiento de plantaciones como una estrategia conservacionista, conciliatoria y factible. La FAO (1997) considera la caoba una especie prioritaria para plantaciones comerciales, si se cuenta con sitios de buena calidad y se puede controlar el ataque del barrena-

dor de la yema terminal. *Hypsipyla grandella* Zeller, que es la plaga más dañina y difícil de controlar; considerada, hasta hoy en día, el principal obstáculo para garantizar la rentabilidad de tales plantaciones. Una alternativa es buscar la mejora genética para hallar individuos más resistentes e inducir la propagación *in vitro*, con el fin de alcanzar rentabilidad y a su vez la conservación de bosques naturales.

En este trabajo se determinó condiciones de cultivo para la formación de callo en discos foliares con y sin nervadura central en medios que contenían diferentes relaciones de auxina /citoquinina, determinadas por el diseño estadístico Compuesto Central Rotable (CCR). La formación de callo en tejidos de caoba, es un paso inicial para propagación indirecta, bien sea vía embriogénesis somática u organogénesis.

Materiales y métodos

Material vegetal

El material usado fueron hojas muy jóvenes, verdes y extendidas, tomadas del segundo o tercer nudo, de plántulas de caoba obtenidas *in vitro* (Figura 1) a partir de semillas recolectadas de árboles vigorosos y fuste recto,

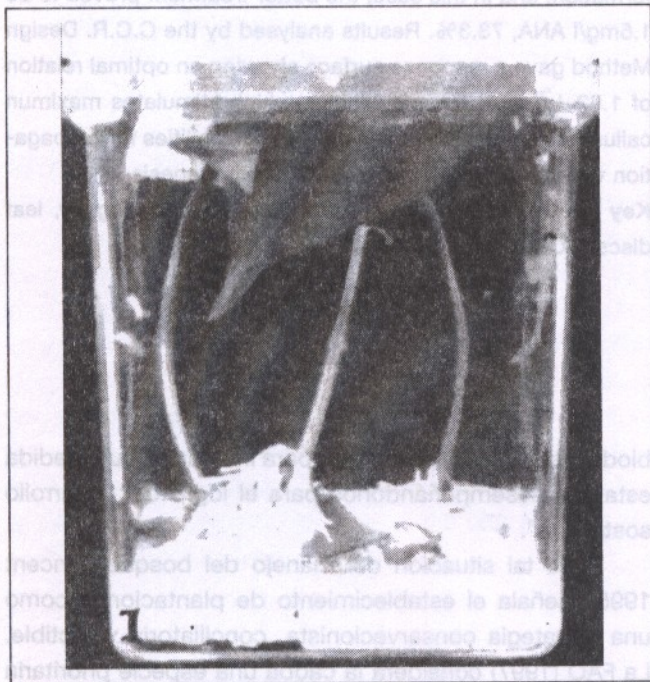


Figura 1. Plantas de caoba, resultantes de la germinación aseptica, de las que se extraen discos foliares.

en la ciudad de Caracas, entre los meses noviembre y diciembre; época de fructificación. Las semillas fueron esterilizadas usando la metodología descrita en Tacoronte y Vielma (2001).

Explantos

Los explantes tomados de las hojas fueron discos foliares de 0,5 cm de diámetro, con nervadura central (CNC) y sin nervadura central (SNC) (Figuras 2a y 2b).

Medios de Cultivo

El medio básico utilizado para la germinación *in vitro* fue el de Murashige y Skoog (1962) a la mitad de la fuerza iónica (1/2 MS). Para el cultivo de los discos foliares se modificó la concentración de NH_4NO_3 de 1,65 g/L a 2 g/L, sacarosa a 2 %, agar a 0,7 % y pH 5,7 – 5,8. El medio fue complementado con diferentes concentraciones de ácido α -naftalenácetico (ANA) y benciladenina (BA) ambas dentro de un rango de concentración 0-3 mg/L, tratamientos que fueron determinados por el CCR (Cuadro 1)

Método de inducción de callo

Los discos foliares fueron cultivados en el medio anteriormente descrito, aplicando en total 10 tratamientos (Cuadro 1). Luego fueron incubados en una cámara de

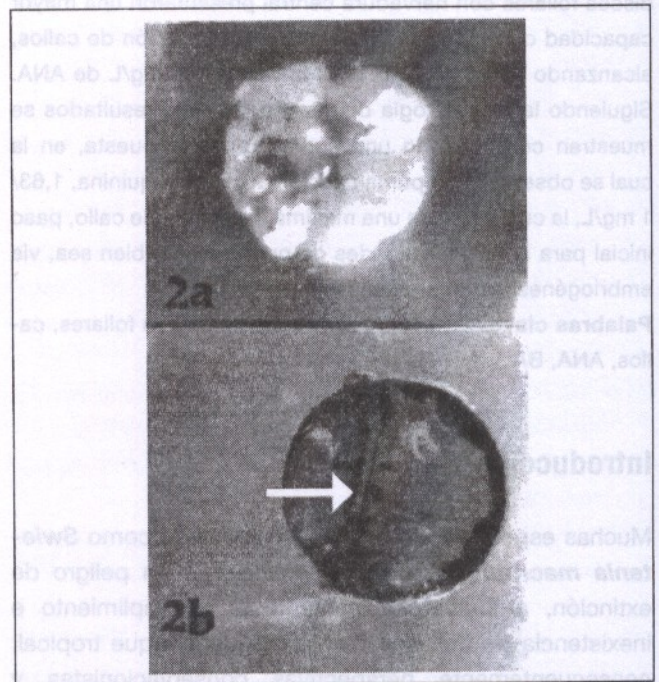


Figura 2. a. Discos foliares sin nervadura central (SNC); b. Discos foliares con nervadura central (CNC).

Cuadro 1. Porcentajes de formación de callos en discos foliares de caoba CNC y SNC, cultivados en diferentes relaciones de concentraciones de ANA y BA.

Nº de tratamientos	ANA/BA mg/L.	% Explantes CNC con callos en nervadura central	% Explantes SNC y con callos en bordes.
1	0,44/0,44	23.3	40.0
2	0,44/2,56	3.3	0
3	2,56/0,44	13.3	10.0
4	2,56/2,56	20.0	6.6
5	1,5/1,5	60.0	30.0
6	3/1,5	43.3	13.3
7	0/1,5	0	3.3
8	1,5/3	43.3	10
9	1,5/0	73.3	3.3
10	0/0	0	0

crecimiento Percival a temperatura $25-26 \pm 2^\circ \text{C}$, en oscuridad total, durante las primeras dos semanas y luego a una intensidad lumínica de 1,675 lux y un fotoperíodo de 16 h luz.

La evaluación de los explantes se realizó cada semana, por un lapso de dos meses, observándose formación o no de callos y de alguna respuesta morfológica.

Diseño estadístico

El análisis estadístico se culminó a través del software SAS (SAS Institute, 1988), aplicando el diseño estadístico CCR, se estableció un límite de confiabilidad de un 95% al repetirse cada tratamiento tres veces para cada tipo de explante y 10 de ellos por tratamiento, por lo tanto la unidad experimental es de 30 explantes por tratamiento, resultando un total de 300 discos foliares con nervadura central y 300 discos foliares sin nervadura central. Los resultados iniciales son presentados como porcentajes de formación de callos en explantes CNC y SNC (Cuadro 1).

Con los resultados de los explantes CNC se hizo un análisis de regresión, donde la variable dependiente corresponde a la formación de callo sujeta a variables independientes representadas por las diversas concentraciones de auxina/citoquinina, por lo tanto, la función matemática queda expresada en la ecuación:

$$(1) Y = f(X_1, X_2) + E \text{ donde:}$$

Y = Variable dependiente (formación de callo)

X_1 = Nivel de concentración de auxina (ANA mg/l)

X_2 = Nivel de concentración de citoquinina (BA mg/l)

E = Error experimental

Modelo polinómico (2 factores)

Para generar la superficie de respuesta, el valor de Y para cada respuesta fue determinado aplicando el modelo polinómico de segundo grado expresado en la ecuación:

$$(2) Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_1^2 + B_4 X_2^2 + B_5 X_1 X_2 + E$$

Donde se sustituyen los valores respectivos generados por el análisis de regresión para cada factor y los valores reales de cada factor por tratamiento. E es el error estándar. Además, se calculó el coeficiente de determinación (R^2) para obtener la proximidad del ajuste de la ecuación de regresión a los valores observados de Y.

Resultados y discusión

En el cuadro 1 se observa el efecto de las relaciones auxina/citoquinina, calculadas aplicando el diseño estadístico CCR y ambas dentro de un rango de concentración 0-3 mg/L, sobre los discos foliares CNC y SNC. La respuesta es expresada como porcentaje de explantes que formaron callos en la nervadura central si son CNC o en los bordes si son SNC (Cuadro 1 y Figuras 3, 4, 5 y 6).

Al aplicar la ecuación (2), la cual describe una parábola y sustituyendo los resultados del análisis de regresión: $Y = 61,22 + 8,78 (\text{ANA}) - 6,67 (\text{BA}) - 26,06 (\text{ANA})^2 - 7,87 (\text{BA})^2 - 5,85 \text{ ANA} * \text{BA}$

La auxina (ANA) toma un valor positivo, indicando que el aumento de su concentración conlleva a una mayor formación de callos, mientras que el aumento progresivo de la concentración de la citoquinina (BA), tiene un efecto contrario al disminuir el porcentaje de la respuesta de ANA (Figura 7). Los valores negativos de los coeficientes cuadráticos (ANA^2 y BA^2) indican que existe una respuesta máxima. El coeficiente de determinación ($R^2 = 0,5312$) indica que la relación auxina /citoquinina interviene en un 52,12% en la formación de callos en la nervadura central.

La figura 7, conforma una superficie de respuesta en la cual se observa el efecto lineal de ANA y el inverso de BA. El punto de máxima respuesta coincide con el tope de la superficie graficada y al ser proyectada simultáneamente a los ejes de concentraciones hormonales, se obtuvo una relación óptima ANA/BA = 1,63/2 a la cual debe responder un 62,95% de los discos foliares CNC.

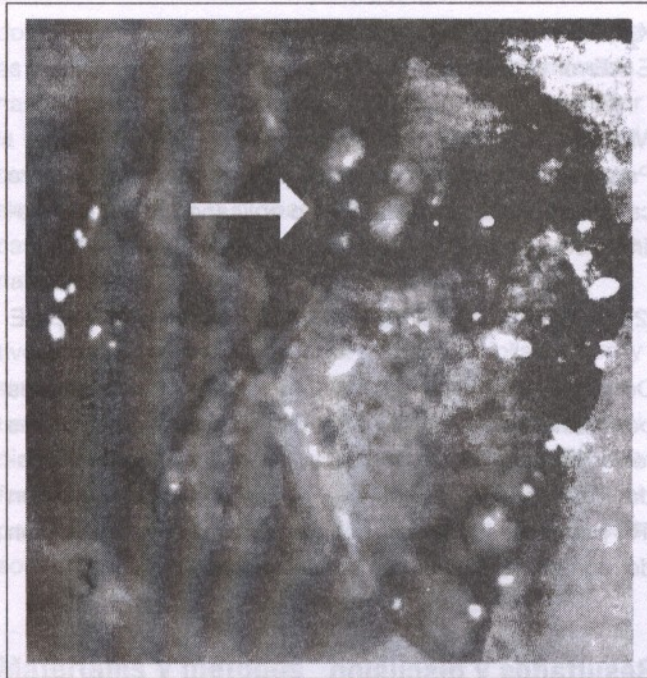


Figura 3. Protuberancias formadas en la nervadura central del disco foliar.



Figura 4. Rizogénesis a partir de las protuberancias formadas en la nervadura central.

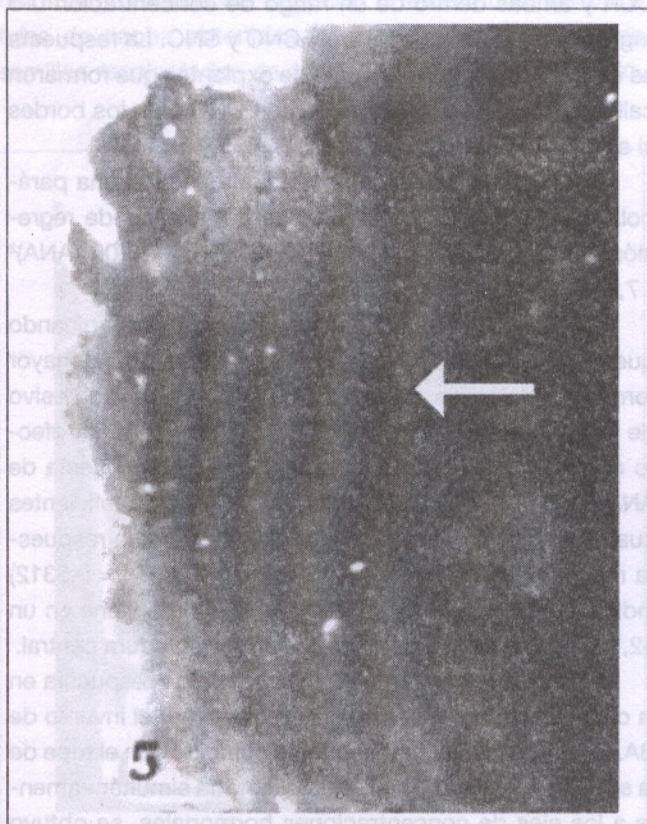


Figura 5. Callos friables, color crema, formados en el borde del disco foliar SNC.



Figura 6. Callos formados en diferentes zonas del disco foliar, se desarrollan en conjunto y cubren todo el explante.

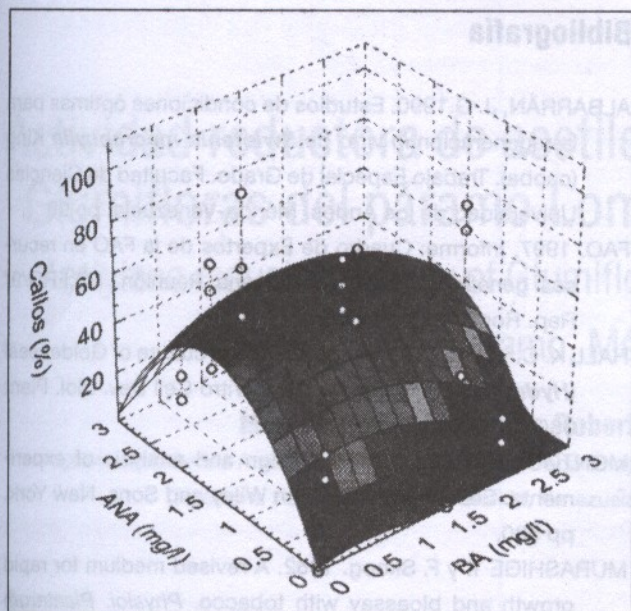


Figura 7. Superficie de respuesta de formación de callos para discos foliares en nervadura central.

El diseño CCR fue aplicado por Tacoronte *et al.* (2004) en el cálculo de óptimas relaciones de ANA/BA en el desarrollo *in vitro* de yemas axilares de caoba, determinando un rango óptimo de 0,38 - 0,4 mg/L para ANA y de 0,61 - 1,94 mg/L para BA. La aplicación del CCR en este trabajo corrobora la funcionalidad del mismo, al ser usado para determinar relaciones óptimas de dos (2) factores que actúen simultáneamente en tejidos vegetales cultivados en condiciones controladas, en búsqueda de una respuesta deseada.

No fue realizado un análisis estadístico para tener diferencias significativas entre los resultados de discos foliares CNC y SNC, pero es evidente que la zona de mayor formación de callos es la nervadura central. También se puede observar que el control (tratamiento 10) sin fitohormonas no produjo callos en ninguna de las dos condiciones del explante.

El control confirma la necesidad de cultivar los discos foliares de caoba con ciertas concentraciones de auxina/citoquinina para obtener el estímulo inductor de callo. Se comprueba que es la auxina, básicamente, la fitohormona que estimula esa respuesta, esto se observa en el tratamiento 9 donde la auxina actúa en una concentración de 1,5 mg/L y no hay presencia de citoquinina, además, se alcanzó el mayor valor en la formación de callos en la nervadura central (73,3%). Sucede lo contrario con la relación 0 mg/L de auxina y 1,5 mg/L de citoquinina (tratamiento 7),

pues no hubo inicio de callo en la nervadura y solo un explante formó callosidad en el borde del disco (Figura 5).

La variedad de respuesta obedece básicamente al tipo de tratamiento y tipo de explante con y sin nervadura central. En el tratamiento 9, los explantes CNC forman callo en los extremos de la nervadura, además, fue el único tratamiento que presentó respuesta morfogénica ya que el 35% de los explantes produjo inicialmente protuberancias y posteriormente de las mismas se desarrollaron raíces (Figuras 3 y 4); en cambio, para este mismo tratamiento, en los discos foliares SNC, solo un explante formó callo (3,3%). Sigue el tratamiento 5 (1,5/1,5 mg/L) con 60% de explantes que presentaron callos en la nervadura central y 30% en los bordes. Los tratamientos 6 y 8 ambos produjeron callos en el 43,3% de los explantes con nervadura central. Los tratamientos de baja o ninguna respuesta en la nervadura central, son: el tratamiento 2 con un solo explante que representa el 3,3%, el 7 y 10 sin respuesta. Los tratamientos 1 y 5 (40% y 30%) alcanzaron los máximos valores, en los explantes sin nervadura central, sólo cuando las concentraciones de ambas hormonas se mantenían bajas, intermedias e iguales. En el tratamiento 4 las concentraciones eran las mismas para ANA y BA, pero muy altas (2,56 mg/L) por lo cual la formación de callos en los bordes apenas fue de un 6,6%. A concentraciones mayores de 1,5 mg/L, la citoquinina (BA) comienza a inhibir la inducción de callo.

Las relaciones de ANA/BA han sido usadas para inducir callo en tejidos vegetales. Sin embargo, existen factores determinantes tales como: la especie o el tipo de explantes que junto con las concentraciones fitohormonales determinarán la búsqueda de la respuesta; en este sentido Tokuhara y Mii (2001) promovieron la formación de callo en yemas vegetativas de *Phalaenopsis* con una relación de 0,093 mg/L de ANA y 1mg/L de BA. Hall y Camper (2002) no observaron diferencias significativas en la formación de callo de hojas y raíces de *Hydrastis canadensis* L., cultivadas en diferentes relaciones de ANA/BA en los rangos de 0-10 μ M para ambas hormonas.

Albarrán (1995) usando el mismo medio básico de cultivo, pero complementado con bajas concentraciones de tidiazurón (0,04 mg/L) y altas de 2,4-D (2 mg/L), obtuvo la mayor respuesta en explantes que incluyeron el nervio medio; en un lapso de 15 a 22 días el callo terminaba por expandirse llegando a cubrir todo el disco foliar; a medida que aumentaba la concentración de tidiazurón disminuía el porcentaje de formación de callos, independientemente de la concentración del 2,4 D. Los callos necrosaron y

murieron al ser subcultivados tanto en luz como en oscuridad. Usando una relación AIA (0,2, 1,0, 2,0 mg/L) / BA(2,0 mg/L) no se produjo ninguna respuesta de callo ni morfogénesis. En este trabajo, la obtención de callos con ciertas relaciones auxina/citoquinina (ANA/BA), coincide con los resultados anteriores; los callos iniciaban su formación aproximadamente al mes de cultivo e igualmente la zona de mayor estímulo fue la nervadura central. Los callos crecían y se expandían hasta llegar a cubrir todo el explante (Figura 6) y finalmente al ser subcultivados se necrosaron.

Es importante tomar en cuenta la asociación de la luz con la respuesta, se comprobó que algunos discos foliares incubados inicialmente en oscuridad total (resultados no mostrados), respondían produciendo un mayor número de callos que los expuestos desde un inicio a fotoperíodo; la razón de esto puede ser que la luz estimule la fotosíntesis y se ve disminuida la división celular y por lo cual es menor la proliferación de callos.

Conclusiones

En discos foliares de plántulas de caoba, la zona de mayor capacidad de respuesta para la formación de callos resultó la nervadura central. La frecuencia de respuesta se relaciona directamente con las concentraciones de ANA/BA. Los callos en los discos foliares se ven estimulados con el aumento de auxina, mientras que las concentraciones de citoquinina tienen que ser bajas o nulas, para no obstaculizar la respuesta. Entre los factores ambientales la luz demostró ser determinante en la respuesta buscada, ensayos con discos foliares incubados durante las dos primeras semanas, respondieron con mayor formación de callos. Por otra parte, la efectividad del diseño estadístico Compuesto Central Rotable fue demostrada al determinar un rango óptimo de ANA/BA en 1,63mg/l para la formación del mayor número de callos en explantes de discos foliares de caoba que incluyen la nervadura central.

Agradecimiento

Nuestro agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes, por el financiamiento otorgado bajo el Código CVI- PIC- 02- 98 y al Sr. Sócrates Pérez por el trabajo fotográfico.

Bibliografía

- ALBARRÁN, J. G. 1990. Estudios de condiciones óptimas para la regeneración *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (caoba). Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela. pp 99
- FAO. 1997. Informe: Cuadro de Expertos de la FAO en recursos genéticos forestales. Novena Reunión. FO:FRG/9/ Rep. Roma, Italia, pp 58.
- HALL K. C. y N. D. Camper. 2002. Tissue culture of Goldenseal (*Hydrastys canadensis* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 38(3): 293-295.
- MONTGOMERY, D C. 1983. Design and analysis of experiments. Second Edition. John Wiley and Sons. New York. pp 530.
- MURASHIGE T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco. *Physiol. Plantarum* 15: 437-497.
- PELLEW, R. 1996. Evaluación mundial de la biodiversidad biológica. *Rev. Nuestro Planeta*. ONU 7(5) 40-45
- TACORONTE, M. y M. Vielma. 2001. Germinación *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba). *Revista Forestal Venezolana* 16 (2):192-203.
- TACORONTE, M, M. Vielma, A. Mora y C. Valecillos. 2004. Propagación *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de yemas axilares. Aceptado en *Acta Científica Venezolana*.
- TOKUHARA, K. y M. Mii. 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from Shoot tips excised from flowers stalk buds of *Phanaeopsis* (Orquidaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37(4): 457-461.
- SAS Institute INC.1988. SAS7STAT™ User'sGuide,Release 6.03 edition.Cary, NC. SAS Inst.Inc.
- VINCENT, L.1995. Un enfoque de la orientación del manejo del bosque tropical alto. Publicación de la Universidad de Los Andes, Centro de Estudios Forestales de Postgrado. pp 117-142.