

GERMINACIÓN *IN VITRO* DE *Swietenia macrophylla* King (caoba)

Melángel Tacoronte B. y María Vielma A.

RESUMEN

La germinación *in vitro* de semillas de caoba, como todo procedimiento aséptico, requiere de una esterilización estricta, para tal fin se estableció una metodología de desinfección de las semillas, aplicando diferentes soluciones de productos comerciales tales como Jabodine, hipoclorito de sodio y ampicilina. Fueron aplicados ocho tratamientos de desinfección, resultado de diferentes combinaciones, incluyendo el control con agua destilada estéril. El tratamiento más efectivo fue la aplicación de Jabodine al 2% seguida de hipoclorito de sodio al 2%, durante quince minutos cada una. La ampicilina no produjo ningún efecto. Igualmente se estableció una metodología para evaluar la germinación *in vitro*, lo que permitió precisar un período energético germinativo, tiempo en el cual se alcanza la máxima germinación media diaria y que garantiza la obtención de plántulas vigorosas, utilizadas como fuentes de explantes para cultivos *in vitro*.

Palabras clave: caoba, semillas, asepsia, germinación *in vitro*.

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES Facultad de Ciencias Departamento de Biología. Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales *in vitro*..

Agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico - ULA por el financiamiento del proyecto - CVI - PIC0298 - Mérida - Venezuela.

GERMINATION IN VITRO OF
Swietenia macrophylla King (mahogany)

Melángel Tacoronte B. and María Vielma A.

SUMMARY

Germination in vitro of mahogany seeds, as every aseptic procedure, requires a strict sterilization, for such an objective, a methodology of disinfection of the seeds was established, applying different solutions of such commercial products as Jabodine, hypochlorite of sodium and ampiciline. Eight disinfection treatments were applied, result of different combinations, including the control with sterile distilled water. The most effective treatment was the application from Jabodine to 2% followed by hypochlorite of sodium to 2%, during fifteen minutes each one. The ampiciline did not produce any effect. Equally, a methodology was established to evaluate germination in vitro, what allowed to specify a germinative energetic period, time in which the maximum daily average germination is reached and that it guarantees to obtain vigorous seedlings, used as explant sources for cultures in vitro.

Key word: mahogany, seeds, asepsis, germination, in vitro.

INTRODUCCION

Swietenia macrophylla King, conocida comúnmente como caoba es uno de los géneros de la familia Meliaceae más importante desde el punto de vista forestal. Esta distribuida desde la península de Yucatán en México, extendiéndose por Centroamérica, continua a través del Norte de Sudamérica (Colombia y Venezuela), hasta alcanzar las tierras bajas amazónicas de Ecuador, Perú, Brasil y Bolivia, encontrándose principalmente en altitudes de 0 a 450 m.s.n.m. (FAO, 1997).

Por lo general, *S. macrophylla*, florece al inicio de las lluvias en la parte norte de Sudamérica (Karani, 1973 citado por la FAO 1997) y la época de reproducción de semillas varía en función de las áreas de distribución de la especie. En Venezuela, el pico de producción ocurre entre los meses noviembre y diciembre. El peso de 1000 semillas es de aproximadamente 450 a 660 g.

La tasa de germinación de semilla fresca es de 60 a 90% (FAO 1997), sin embargo, no se cuenta con un alto porcentaje de regeneración natural, esto se debe a la extracción indiscriminada de individuos de grandes dimensiones portadores de semillas al bosque natural, hecho señalado por (Plonczak, 1993) para la zona de los llanos occidentales de Venezuela. Vincent (1995) señala que el establecimiento de plantaciones funcionaría como una estrategia conciliatoria, ante hechos devastadores y amenazas crecientes a la biodiversidad.

La caoba es considerada una especie prioritaria para el establecimiento de plantaciones, sobre todo si se cuenta con sitios de buena calidad y se puede controlar del ataque del barrenador de la yema terminal *Hypsipyla grandella* Zeller (FAO, 1997). Pero, lo difícil del control de esta plaga y la necesidad de cubrir una demanda maderera en los mercados nacionales e internacionales, nos ha llevado a estandarizar una metodología de propagación de caoba, la investigación se inicio con una germinación *in vitro* para tener una fuente de explantes vigorosos con mayor potencial, que junto a medios de cultivos y condiciones ambientales favorables se alcanzaron excelentes resultados de propagación masiva. La meta final de estas investigaciones es evaluar las poblaciones obtenidas *in vitro*, en busca de individuos resistentes a la *hypsipylla*, para luego propagarlos masivamente por el método más conveniente, bien sea tradicional o *in vitro*.

Método de esterilización de semillas.

Fueron establecidos, varios métodos para esterilizar las semillas de caoba con la finalidad de determinar entre ellos el tratamiento efectivo. Se procedió a tratarlas con soluciones básicas de Jabodine, ampicilina y solución de hipoclorito de sodio, para ello se eliminó la cubierta seminal (testa), luego el endospermo fue lavado con abundante agua destilada estéril y posteriormente se aplicaron los distintos tratamientos seguidos cada uno con lavados abundante usando agua destilada estéril. (Tabla 1). Los tratamientos se determinaron en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales in vitro de la Facultad de Ciencias – Universidad de los Andes.

Tabla 1. Tratamientos usados en la esterilización de semillas de caoba

N° DE TRATAMIENTO	COMPOSICIÓN DEL TRATAMIENTO
1	Jab.
2	Amp.
3	Hip.de sodio
4	Jab. y Amp
5	Jab. e Hip. de sodio
6	Amp. E Hip. de sodio
7	Jab., Amp. e Hip. de sodio
8	Agua destilada estéril.

Jab.: Jabodine 2%

Amp. Ampicilina 250 mg/l

Hip.: Hipoclorito de sodio 1%

La aplicación de cada tratamiento se realizó en la cámara de flujo laminar siguiendo los pasos que a continuación se describen:

1. Se sumergieron las semillas en la solución esterilizante correspondiente por 15 min. La aplicación no fue simultánea sino una después de la otra.
2. Fueron lavadas cuatro veces con agua destilada estéril antes y después del uso de cada solución esterilizante.
3. Se procedió a la siembra de semillas tratadas.

OBSERVACIONES:

- El control consiste en lavar los endospermos con abundante agua destilada estéril y sembrarla en el medio de cultivo.
- El jabodine es una fórmula yodada y trae incorporado polivinilpirrolidona (PVP), útil para contrarrestar los efectos de la segregación de fenoles, en este caso estimulado por el proceso de esterilización. El PVP es un polímero que absorbe las sustancias de tipo fenólico (Johansson, 1983 citado por Pierik, 1990).

Distribución de los tratamientos: Se utilizaron un total de 80 foias, 10 por tratamiento y cada una con tres semillas cultivadas.

Medio de cultivo y condiciones de incubación.

Se utilizó el medio de Murashige y Skoog (1962) a la mitad de la fuerza iónica, modificando la concentración de sacarosa 20gr/l, agar al 0,7%, ajustando un pH a $5,7 \pm 0,1$ y luego se procedió a esterilizar los medios.

Las condiciones ambientales, en cámaras de crecimiento, fueron: luz blanca fluorescente con intensidad de 40-45 moles/m² *s, fotoperíodo de 16h. luz y 8h. de oscuridad y temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Método de evaluación de la germinación

Para precisar el período energético germinativo, se hizo un conteo diario de germinación de 124 semillas, sembrando 3 semillas por cajas y repitiendo el ensayo dos veces. Los datos promedios diarios fueron representados gráficamente (semillas germinadas vs. tiempo). Se determinó el período energético germinativo comprendido desde el primer día de germinación hasta el día en que se produjo el mayor porcentaje de germinación efectiva diario (Szabator, 1989 citado por Parraguirre y Camacho, 1992)

Resultados y Discusión

Los resultados de la aplicación de los diferentes tratamientos de esterilización en las semillas de caoba son mostrados en la tabla 2 y Figura 1, como porcentaje de contaminación. La efectividad de cada tratamiento fue evaluada en función de la presencia o no de bacterias y/o hongos.

Tabla 2. Porcentaje de contaminación de semillas de caoba sometidas a diferentes tratamiento de esterilización y cultivadas *in vitro*.

N° DE TRATAMIENTO	% DE CONTAMINACIÓN
1	100
2	100
3	68
4	100
5	46
6	76
7	63
8	100

El tratamiento control (Fig. 1.1) presento una contaminación en todas las semillas, la causa fue el no tratarlas con ninguna solución esterilizante. Sin embargo, el 100% de contaminación también se presentó en los tratamientos 1, 2 y 4, demostrando la poca efectividad de la ampicilina y jabodine, por sí solos. En el tratamiento 3, donde se usó únicamente el hipoclorito, se observa que baja la contaminación al 68%. Cuando el hipoclorito es combinado con la ampicilina (Fig- 1.2) o con jabodine como sucede en los tratamientos 5, 6 y 7 con 46%, 76%, 63% respectivamente, se observa también una disminución de la contaminación. La aplicación de hipoclorito, y jabodine (Fig-1.3), resulta ser la combinación más efectiva, no siendo así los resultados obtenidos al usar la ampicilina (Fig. 1.4) por lo que es descartada finalmente en posteriores experimentos.

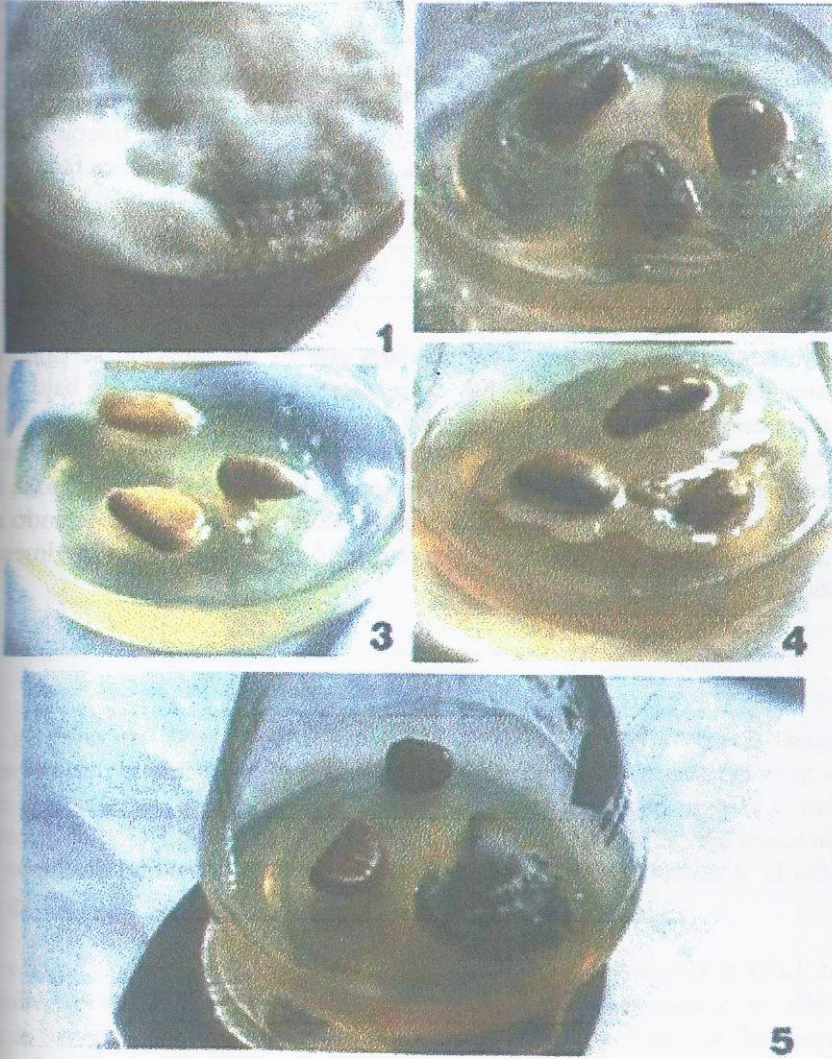


Fig-1.1 Semillas de caoba no esterilizadas resultando la máxima contaminación. Fig-1.2 Semillas tratadas con ampicilina e hipoclorito 76% Fig1.3 Semillas esterilizadas con Jabodine 2% e hipoclorito al 1%. Fig. 1.4 Tratamiento solo con ampicilina a 250mg/l. Fig.-1.5 Combinación de las tres soluciones ampicilina, Jabodine e hipoclorito.

Se puede evidenciar que ningún tratamiento fue óptimo, en busca del mismo se tomó en cuenta la interacción de otros factores como: recolección, tiempo de almacenaje y preservación de las semillas, tratamiento de esterilización y tiempo de inmersión de las semillas. Según FAO (1997), las semillas de caoba deben ser conservadas en frío (2 a 5°C), hasta por un año ya que bajo condiciones naturales, la capacidad de germinación se pierde en pocos meses, además solo la tasa de germinación es alta (60 a 90%), si la semilla es fresca

En este ensayo comprobamos que una alta tasa de germinación se obtiene con semillas frescas, de apenas días de recolectadas y almacenadas bajo frío hasta 6 meses después de ser preservadas con Manzate (producto comercial - fungicida de amplio espectro). Luego de cumplir con todos estos procedimientos, se siguió con la esterilización de las semillas de caoba para su cultivo *in vitro*, usando el Jabodine 2% y el hipoclorito de sodio, aumentando su concentración de 1 a 2%, de esta manera resultó una germinación totalmente aséptica, es decir, 0% de contaminación.

Evaluación de la germinación

Tabla 3. Resultados de germinación promedio diaria de semillas de caoba cultivadas *in vitro*.

Días de Germinación	Semillas germinadas	Germinación Acumulada	% de germinación acumulado
1	0	0	0
2	0	0	0
3	24	24	18,46
4	30	54	41,53
5	38	92	70,76
6	19	111	85,38
7	7	118	90,76
8	6	124	100

La germinación *in vitro* comienza el tercer día de cultivo con 24 semillas germinadas, va ascendiendo hasta quinto día, el cual es de máxima respuesta con 38 semillas germinadas, y con un valor acumulado de 92 semillas, representando 70,76% de germinación, luego a partir del sexto día desciende a 19 semillas germinadas, el séptimo día sólo 7 semillas y finalmente el octavo día germinaron 6, llegando a un total de 100% de germinación.

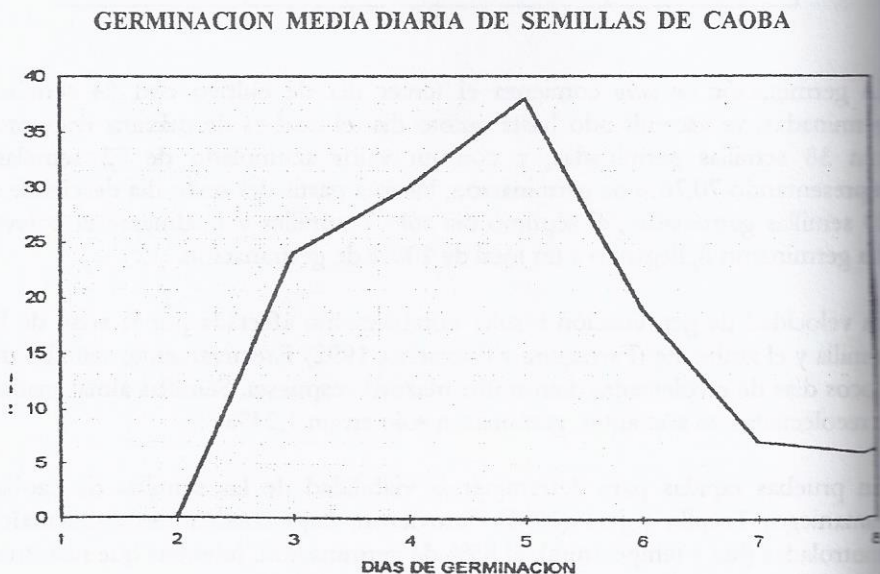
La velocidad de germinación resulta notablemente afectada por la edad de la semilla y el ambiente (Parraguire y Camacho, 1992) Efectivamente, semillas de pocos días de recolectadas dieron una máxima respuesta. Semillas almacenadas o recolectadas un año antes, germinaron solo en un 1,24%.

En pruebas rápidas para determinar la viabilidad de las semillas de caoba, Samaniego, Trujillo y Jara (1995) obtuvieron, bajo condiciones ambientales controladas (luz y temperatura), el 85% de germinación, mientras que nosotros en condiciones *in vitro* se obtuvo el 100% de germinación.

El porcentaje de germinación en ningún momento indica si todas las plántulas resultantes tiene el mismo vigor y capacidad como para que los explantes aislados de ellas respondan en cultivo, por lo que determinar un período energético de germinación fue de gran importancia. Según Cazbator (1989, citado por Parraguire y Camacho 1992), este período termina cuando se alcanza la máxima germinación media diaria, (Fig. 2) las semillas que germinan fuera de este lapso, son consideradas débiles y producen plántulas con pocas probabilidades de sobrevivir.

Se observa en la curva (Fig. 2) que la máxima germinación media diaria corresponde al quinto día de siembra con 38 semillas germinadas y con un 70% de germinación acumulada o germinación efectiva, este punto máximo señala el fin del período energético germinativo, es decir, que las 124 semillas sembradas 92 germinaron dentro del período energético y las 32 semillas restantes están fuera del lapso, las cuales son consideradas débiles y producen plántulas de poca probabilidad de sobrevivencia.

Figura 2. Germinación media diaria de semillas de caoba



Una plántula vigorosa, germinada dentro del período energético, en condiciones *in vitro*, y los explantes aislados de ella, se muestran en la figura 3, estos explantes son cultivados también en condiciones asépticas para lograr la propagación vegetativa de esa planta.

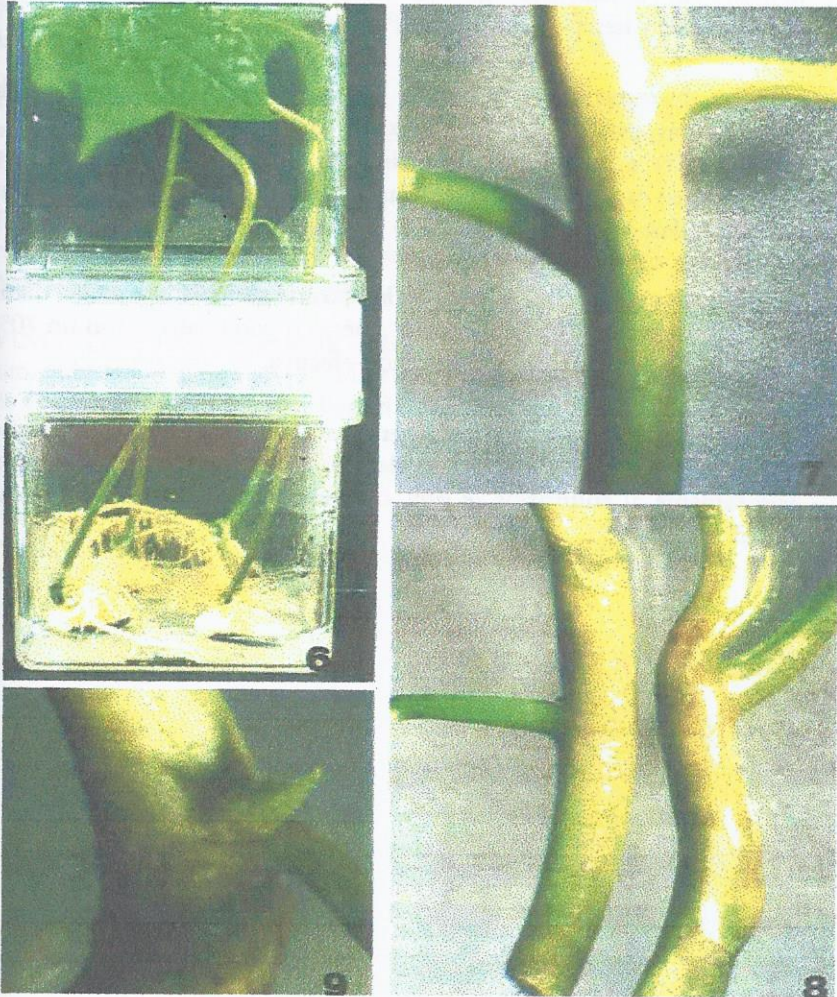


Figura3. Plántula de Caoba germinada *in vitro* y los distintos explantes aislados

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Para garantizar un alto porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de caoba, necesariamente debe tomarse en cuenta la interacción: recolección y tiempo de almacenaje de semillas, preservación, tratamiento de esterilización y tiempo de inmersión en las soluciones esterilizantes.
- Semillas de inmediata recolección o preservadas con Manzate a bajas temperaturas por un tiempo máximo de un año, esterilizadas con Jabodine 2% e hipoclorito de sodio 2%, cumpliéndose 20 minutos de inmersión en cada solución esterilizante, produjeron 100% de plántulas no contaminadas.
- El quinto día de siembra se obtiene la máxima germinación media diaria, lo que representa el final del período energético germinativo, con un 70% de germinación acumulada o germinación efectiva.
- Dentro de este período energético germinativo se garantiza la obtención de plántulas vigorosas, cuyos explantes son capaces de responder exitosamente al cultivarlos *in vitro*, obteniendo finalmente la propagación clonal.

BIBLIOGRAFÍA.

1. FAO. 1997. Recursos genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los Neotrópicos: Propuestas para Acciones Coordinadas. Editor Fernando Patiño V. Dirección de Recursos Forestales, Departamento de Monte, Roma, Italia. 58p.
2. MURASHIGE, T Y F SKOOG. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco Tissue Culture. *Plant. Physiol.* 15: 437-497.
3. PARRAGUIRRE, L.C Y CAMACHO, MF. 1992 Velocidad de germinación de veinte y una especies forestales tropicales. *Rev. Ciencias Forestales.* México 17: 3-26.
4. PLOZCHAK, M. 1993 Estructura y dinámica de desarrollo de bosque naturales manejados bajo la modalidad de concesiones en los llanos Occidentales de Venezuela. IFLA. Mérida, Venezuela.
5. 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. pp117-142. Descripción de las columnas.

PLS
BIB. IOTEGA