



**UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS**  
**VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS**

---

**TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO ACADÉMICO DE**  
**MAGISTER SCIENTIAE EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

***EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.***  
***EN MEDIOS DE CULTIVO SEMISÓLIDOS***

**ASPIRANTE: Lic. Iván Borroto Rodríguez.**

**TUTOR: Dr. C. Raúl Barbón Rodríguez.**

**Santa Clara, CUBA**

**2008**

## Resumen

La presente investigación se realizó con el objetivo de establecer la embriogénesis somática en *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. en medio de cultivo semisólido para lo cual se utilizaron como material inicial secciones cotiledonales. Los resultados demostraron que el mayor porcentaje de formación de callo (95.30%) a partir de secciones cotiledonales se logró al emplearse una concentración de 6.0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D combinado con 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de Kinetina en el medio de cultivo. En la formación y diferenciación de embriones somáticos el mejor resultado se logró con una concentración de 4.0 mg.L<sup>-1</sup>; con la cual se obtuvieron los mayores porcentajes (55.0% y 92.0%) de ESAF y ESBF, el mayor número (36.7%) de embriones somáticos por callo y embriones en etapa globular, torpedo y cotiledonal. Se demostró la necesidad de una fase de maduración para incrementar el porcentaje de germinación de los embriones somáticos con 4.0% y 6.0% de sorbitol. Los mayores porcentajes de germinación completa (72.0% y 82.8%) y parcial (54.0% y 60.0%) se lograron en un medio de cultivo suplementado con 0.25 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP, con embriones somáticos madurados en medio de cultivo con una concentración de 4.0% y 6.0% de sorbitol.

## Índice

1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	3
2.1. Características generales de <i>Swietenia mahagoni</i> (L.) Jacq.	3
2.2. Importancia del cultivo	4
2.3. Propagación	5
2.3.1. Propagación <i>in vitro</i>	6
2.4. Embriogénesis somática	7
2.4.1. Fases de la embriogénesis somática	9
2.4.1.1. Inducción de los embriones somáticos	10
2.4.1.2. Desarrollo de los embriones somáticos	11
2.4.1.3. Proliferación de los embriones somáticos	12
2.4.1.4. Maduración de los embriones somáticos	13
2.4.1.5. Germinación y conversión de embriones somáticos en plantas	13
2.4.2. Factores que afectan la embriogénesis somática	14
2.4.2.1. Genotipo de la planta	14
2.4.2.2. Componentes del medio de cultivo: Reguladores del crecimiento	15
2.4.2.3. El tipo y el estado fisiológico del explante	17
2.4.2.4. Condiciones de cultivo	18
3.0. Materiales y Métodos	20
3.1. Inducción y formación de callo en <i>Swietenia mahagoni</i> (L.) Jacq	22
3.1.1. Efecto de 2,4-D y la kinetina en la inducción y formación de callo	22
3.2. Formación y diferenciación de embriones somáticos de <i>Swietenia mahagoni</i> (L.) Jacq.	23
3.2.1. Influencia del 6-Bencilaminopurina (6-BAP) en la formación y diferenciación de embriones somáticos	23
3.3. Maduración y germinación de los embriones somáticos <i>Swietenia mahagoni</i> (L.) Jacq.	25
4. Resultados y Discusión	27
4.1. Inducción y formación de callo en <i>Swietenia mahagoni</i> (L.) Jacq	27
4.1.1. Efecto de 2,4-D y la kinetina en la inducción y formación de callo	27
4.2. Formación y diferenciación de embriones somáticos de <i>Swietenia mahagoni</i> (L.) Jacq.	29
4.2.1. Influencia del 6-Bencilaminopurina (6-BAP) en la formación y diferenciación de embriones somáticos	29
4.3. Maduración y germinación de los embriones somáticos <i>Swietenia mahagoni</i> (L.) Jacq.	35
5. Conclusiones	42
6. Recomendaciones	43
7. Referencias bibliográficas	44

## 1. Introducción

*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq., es una de las especies maderables más valiosas del mundo, pertenece a la familia *meliaceae*. Se conoce con los nombres comunes de caoba, caoba antillana o caoba de Cuba (Betancourt, 1999).

Casi desde el comienzo de la colonización del Caribe y durante mucho tiempo después la caoba cubana ha sido objeto de la explotación irracional, lo que ha ocasionado que en la actualidad la especie casi no se comercialice y haya sido incluida en el apéndice II de CITES como especie amenazada. Debido a la creciente demanda de productos forestales se hace cada vez más necesario el establecimiento y desarrollo de métodos de propagación más eficientes y dinámicos que suplan la necesidad de este recurso renovable y alivien la presión de deforestación sobre los ecosistemas naturales.

La propagación vegetativa representa una vía más directa para mantener características genéticas de un árbol elite. 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, proveniente de la selección de poblaciones, del mejoramiento convencional o de un número limitado de semillas de polinización controlada (Altman y Loberant, 1998).

Los sistemas más corrientemente usados en la regeneración de especies forestales son la organogénesis y la embriogénesis somática (Peña y Seguin, 2001).

La embriogénesis somática ha devenido como el proceso morfogénético 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 ( Merkle y Trigiano , 1992)

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado se propone la siguiente hipótesis de trabajo

“ Es posible desarrollar la embriogénesis somática en *Swietenia mahagoni* (L.)Jacq. en medio de cultivo semisólido”.

Para ello se proponen los siguientes objetivos:

- Evaluar diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento en la inducción y formación de callo.
- Evaluar diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento en la diferenciación y desarrollo de embriones somáticos.
- Determinar la influencia de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento y azúcares en la maduración y germinación de embriones somáticos.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Características generales de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq

*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq., es una de las especies maderables más valiosas del mundo, pertenece a la familia *meliaceae*. Se conoce con los nombres comunes de: caoba, caoba antillana, caoba de Cuba (Betancourt, 1999).

La caoba es un árbol que puede llegar a alcanzar hasta 25 m de altura y hasta 2 m de diámetro, con presencia de contrafuertes en la base; la corteza es inicialmente lisa, grisácea y con abundantes lenticelas, con la edad se vuelve fisurada y pardo rojiza (Puentes, 2005).

Los árboles son de fuste corto y ramificado si crecen aislados; pero cuando se desarrollan en competencia, son rectos y su fuste tiene mayor longitud. La copa es amplia y frondosa y la ramas gruesas. Las hojas son compuestas y alternas, comúnmente paripinnadas, y de 10 cm a 30 cm de largo. Las inflorescencias forman panículas axilares de 5 a 18 cm de largo con flores pequeñas. Los frutos son cápsulas leñosas, piriformes de color castaño claro que miden entre 8 y 10 cm de largo y de 4 cm a 6 cm de diámetro, con dehiscencia septicida a partir de la base; cada fruto contiene entre 45 y 60 semillas. Las semillas están provistas de alas membranosas y son de color castaño claro; miden entre 5 cm y 7 cm de largo y, aproximadamente, 1,3 cm de ancho, se encuentran imbricadas en la cápsula en dos series (Betancourt, 1999).

La caoba cubana se encuentra en toda Cuba, Las Antillas y Florida. En bosques semicaducifolios, con preferencias en suelos profundos ligeramente ácidos, aunque puede encontrarse sobre casi todos los suelos de Cuba con excepción de los extremos lateríticos y arenosos (Bisse, 1988).

La especie es sobreexplotada en muchas de sus áreas de distribución natural y ha sido registrada en el Apéndice II de CITES como especie en peligro de extinción. La caoba ha sido extensivamente plantada principalmente en el Sudeste Asiático, Oceanía y África Oriental (Schmidt y Jøker, 1999).

*Swietenia macrophylla* y la caoba cubana se cruzan libremente cuando crecen cerca una de otra (Francis, 1991). El híbrido interespecífico ha sido observado en Cuba desde el año 1962; probablemente existían con anterioridad algunos ejemplares, pero no se habían detectado. Las

características intermedias (principalmente de las hojas y los frutos) y el crecimiento más rápido que el de las especies progenitoras, denota heterosis o vigor híbrido (Betancourt, 1999). Puentes (2005) observó que las diferencias apreciadas en la madera de la especie se tratan de diferencias debido a la edad del árbol, la clase de terrenos y la parte de la planta que se utiliza y no a características genéticamente fijadas.

## **2.2. Importancia del cultivo**

La madera de la caoba antillana se usa en trabajos de ebanistería fina, objetos torneados, decorado interior, cajas de radio, marcos de puerta y toda clase de obras que requieran madera de alta calidad. Las existencias de esta madera han disminuido tanto que ya prácticamente no se exportan (Betancourt, 1999).

La caoba antillana es una de las especies maderables más atractivas del mundo, por el lustre, color y grano de su madera, y la inmunidad al ataque de insectos. Es por ello una madera altamente cotizada en el mercado internacional (Pennington y Styles, 1981).

La caoba es utilizada como árbol de sombra y ornamental en parques y avenidas de toda Cuba.

## **2.3. Propagación**

La reproducción natural de la caoba cubana es escasa, en las condiciones naturales del bosque. Es difícil encontrar rodales homogéneos de esta especie en un bosque poco influido por la acción antrópica del hombre; sin embargo, en los secundarios y en los potreros se le haya formando rodales o bosquetes en los que es la especie dominante. La capacidad germinativa de las semillas recién colectadas es alta, generalmente fluctúa entre 80% y 90%; pero si se mantienen al aire libre y temperatura ambiente, pierden rápidamente la viabilidad y a los seis meses esta es casi nula (Betancourt, 1999).

Muchos esfuerzos en la mejora de árboles han hecho uso de la propagación clonal para propagar individuos superiores cuando sea posible. Este método captura todos los efectos genéticos (dominancia, aditividad y epistacia) y permite el desarrollo de genotipos superiores mientras se evita la necesidad de proceder a través de ciclos de cruzamiento. (Campbell *et al.*, 2003).

La propagación asexual con la aplicación de técnicas convencionales (injertos, estacas y margullos) es posible; pero las plantas resultantes pierden rápidamente su valor comercial debido a las múltiples ramificaciones causadas por efectos topofíticos (Patiño, 1997). Aparentemente la vía más apropiada para la reproducción artificial de esta especie en cantidades comerciales es la micropropagación (Rodríguez *et al.*, 2003).

### **2.3.1. Propagación *in vitro***

Las técnicas de propagación *in vitro* fueron desarrolladas para la multiplicación clonal de un genotipo deseado, más adelante a través del tiempo el desarrollo de estas técnicas ha devenido en proveer material vegetal susceptible a ser genéticamente transformado (Merkle y Dean, 2000).

Los sistemas de regeneración de especies arbóreas más corrientemente usados son la organogénesis y la embriogénesis somática. La organogénesis puede ser definida como la producción de plantas a través de la formación de órganos de *novο* a partir de un amplio rango de explantes o masas celulares (Peña y Séguin, 2001).

Hasta el momento, es inexistente la publicación de artículos relacionados con la micropropagación por métodos biotecnológicos de la Caoba cubana. Tacoronte *et al.* (2004) lograron la propagación de *Sweitenia macrophylla* King cultivando segmentos uninodales provenientes de plantas germinadas *in vitro*. El rango óptimo de respuesta en el alargamiento y desarrollo de las yemas axilares lo obtuvieron en una relación de ácido naftaleno acético (ANA) y 6- benciladenina (BA) de 0 a 1,94 mg.l<sup>-1</sup> de cada regulador del crecimiento. El enraizamiento lo obtuvieron en un medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) (MS) reducido a la mitad, suplementado con tiamina 9.9 mg.l<sup>-1</sup>, 0.5mg.l<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB), 0.3 mg.l<sup>-1</sup> de ácido naftalanacético (ANA), sacarosa 40g.l<sup>-1</sup>, gelrite 2.0 g.l<sup>-1</sup> y un pH de 5.7.

Da Cunha *et al.* (2001) lograron enraizar segmentos apicales y brotes de *Swietenia macrophylla* King obtenidos a partir de experimentos de multiplicación *in vitro* en un medio de cultivo con sales MS, suplementado con vitaminas Woody Plant Medium (McCown & Lloyd, 1981) , sacarosa al 3%, 0,7% de agar y 0,1% de PVP (Polivinilpirrolidona) y los reguladores del crecimiento AIB y ANA en un rango de 0,1 a 5, 0 mg.l<sup>-1</sup>.El resultado más eficiente, un 70

% de enraizamiento, lo obtuvieron cuando cultivaron los ápices y segmentos nodales en medios de cultivo que contenían 2.0 y 5.0 mg.l<sup>-1</sup> de ANA.

#### **2.4. Embriogénesis somática**

Las plantas son únicas en su habilidad para producir embriones somáticos (Jayasankar *et al.*, 2001). La embriogénesis somática es un proceso en el cual células somáticas específicas son genéticamente reprogramadas hacia el desarrollo embriogénico (Häggman *et al.*, 2005). Esto no es un fenómeno artificial y es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia (Freire, 2003). Aunque los procesos apomícticos son restrictivos para las células del ápex germinativo o del óvulo en plantas, hay una gran variedad de células somáticas que pueden producir desarrollo embriogénico bajo apropiadas condiciones (Fehér, 2005). La embriogénesis somática *in vitro* es posible debido a que cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión, totipotencia, a través de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores del crecimiento (Freire, 2003).

Los embriones cigóticos y somáticos comparten similares etapas de su ontogenia. Ambos pasan a través de las etapas globular, corazón y torpedo en dicotiledóneas y globular, escutelar y coleóptilar en monocotiledóneas (Toonen y de Vries, 1996).

La embriogénesis somática es un proceso donde embriones somáticos pueden ser obtenidos vía embriogénesis somática directa o vía embriogénesis somática indirecta. En la embriogénesis somática directa, el embrión se origina directamente a partir del tejido en ausencia de callos (Aly *et al.*, 2002); mientras que, en la embriogénesis somática indirecta la proliferación de callos y tejidos embriogénicos antecede el desarrollo del embrión (Fuentes *et al.*, 2000).

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta, una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF) y otra denominada embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF). En la primera, el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos embriones somáticos por callo. Estos embriones aparecen entre las 12 y 14 semanas de cultivo, aislados o en pequeños grupos, y evolucionan completamente hasta las avanzadas etapas de desarrollo. En la segunda, los embriones somáticos aparecen entre las 16 y 20 semanas de cultivo, no se desarrollan completamente y se mantienen en etapa globular,

agrupados en un número mucho mayor, aunque dichos grupos aparecen en un número menor de callos (Freire, 2003).

Desde los primeros estudios, el número de especies de plantas superiores a partir de los cuales embriones somáticos fueron obtenidos y regenerados se ha ido incrementando continuamente (Jiménez, 2001).

Las embriogénesis somática ha devenido en la técnica preferentemente usada en la regeneración de árboles, ya que permite el desarrollo de una planta completa a partir de células individuales, mantiene la identidad clonal y evita fenómenos no deseados como las quimeras (Poupin y Arce-Johnson, 2005); también, permite la propagación clonal a gran escala, la conservación de germoplasma y provee de un sistema ideal para la producción de semillas sintéticas y la transformación génica (Baill *et al.* , 2005).

Los cultivos embriogénicos han sido generados para las especies comerciales más importantes de coníferas y maderables. Sin embargo, en el mejor de estos sistemas se presenta la falta de viabilidad comercial principalmente por dos razones: primeramente, la baja frecuencia de regeneración para la mayoría de los clones deseables, y en segundo lugar el uso de genotipos no probados como semillas y plántulas como materiales de partida en los cultivos (Merkle y Dean, 2000).

#### **2.4.1 Fases de la embriogénesis somática**

El desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye los siguientes pasos:

- Inducción de los embriones somáticos.
- Desarrollo de los embriones somáticos.
- Proliferación de los embriones somáticos
- Maduración de los embriones somáticos.
- Germinación de los embriones somáticos.
- Conversión de los embriones somáticos en plantas.

#### **2.4.1.1. Inducción de los embriones somáticos**

La inducción de la embriogénesis somática consiste en la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido del explante; siendo reemplazado por un programa de expresión del gen o genes de la embriogénesis en aquellas células del tejido del explante inicial, las cuales pudieran dar lugar a embriones somáticos (Gómez, 1998).

Los embriones somáticos pueden formarse directamente en la superficie de un tejido organizado como hoja, segmentos de tallos, embriones cigóticos, a partir de protoplastos o a partir de microsporas; las células de las que se originan estos embriones somáticos pueden ser consideradas como ya determinadas para el desarrollo embriogénico, necesitando solo de condiciones permisivas que permitan su expresión. Los embriones somáticos pueden también formarse indirectamente mediante un paso intermediario de formación de callo; en este caso medios de cultivos más complejos deberían ser usados, incluyendo factores adicionales para inducir desdiferenciación y reiniciación de la división celular de las células ya diferenciadas antes que estas puedan expresar competencia embriogénica (Jiménez, 2001).

La transición de células somáticas a células embriogénicas es mediada por mecanismos adaptativos al stress impuesto por las condiciones del cultivo *in vitro* (Fehér *et al.*, 2003).

Células de explantes no embriogénicos pueden ser inducidas a estados embriogénicos por una variedad de procedimientos que usualmente incluyen la exposición a reguladores del crecimiento, shock por pH, calor o tratamientos con otras sustancias químicas. Sin embargo el procedimiento más común es la exclusión o reducción de la auxina 2,4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) del medio de cultivo. Hasta ahora no está claro aún cuales son los cambios que se deben producir en una célula somática para convertirse en una célula embriogénica capaz de formar un embrión (Jiménez, 2001).

Parece ser que no existe una simple señal universal aplicable a este proceso (Mordhorst *et al.*, 1997) y que en general solamente un número muy limitado de células de un explante dado responden para convertirse en embriogénicas (Toonen y de Vries, 1996).

#### **2.4.1.2. Desarrollo de los embriones somáticos.**

La formación de embriones somáticos a partir de callos a menudo comienza cuando callos embriogénicos son transferidos a medios de cultivo donde la concentración de auxina ha sido reducida o eliminada (Umehara y Kamada, 2005; Yang *et al.*, 2003). Según von Arnold *et al.* (2002) esto se debe a que con la eliminación de la auxina, el bloqueo de aquellos genes requeridos para la transición a la etapa de corazón de los embriones somáticos es removido del medio. Otra posible explicación la aporta Liu *et al.* (1993), estos autores señalan que la presencia continuada de auxina en el medio de cultivo interfiere con el gradiente polar de la auxina que es normalmente establecido durante la embriogénesis somática, obstruyendo el correcto patrón basal apical del embrión.

#### **2.4.1.3. Proliferación de los embriones somáticos**

Uno de los más importantes aspectos de la embriogénesis somática que permite su aplicación en la propagación masiva y la transferencia de genes, es la habilidad de los cultivos embriogénicos de muchas especies de plantas a proliferar o multiplicarse indefinidamente. La proliferación de las células embriogénicas puede desarrollarse por diferentes vías que están aparentemente influenciados por una variedad de factores como: especie, reguladores del crecimiento, fuentes de nitrógeno, etc (Merkle *et al.*, 1995).

Una vez que las células embriogénicas han sido formadas, ellas pasan a proliferar, formando grupos de células pro-embriogénicas. La auxina es requerida para la proliferación pero es inhibitoria para el desarrollo en embriones somáticos (Filonova *et al.*, 2000).

Callos embriogénicos son mantenidos y proliferados en medios de cultivo similares a los usados para la inducción (Kevers *et al.*, 2002).

En ausencia de auxinas exógenas, la histodiferenciación procede normalmente. Si hay auxinas dentro del umbral que permite la histodiferenciación, esta procederá, pero anormalmente. Al aumentar el nivel de auxinas exógenas, se llega a un punto en que la histodiferenciación no pasa más allá de la etapa globular. En este caso, nuevos embriones somáticos se forman del embrión original y se desarrollan hasta la etapa globular, donde se multiplican. Este proceso se

repite mientras el nivel de auxinas exógenas sea suficientemente alto. Este fenómeno se conoce como embriogénesis somática recurrente, repetitiva o secundaria (Parrot, 2000).

.La embriogénesis somática secundaria comparada con la primaria, presenta mayores ventajas tales como: alto coeficiente de multiplicación, independiente de la fuente del explante y repetitividad; además la embriogénesis somática puede ser mantenida por períodos de tiempos prolongados mediante ciclos repetitivos de embriogénesis secundaria (Raemarkner *et al.*, 1995).

#### **2.4.1.4. Maduración de los embriones somáticos**

La etapa de maduración es un complejo período de desarrollo del embrión somático en el cual ocurre la expansión de la célula, la acumulación de sustancias de reserva y se adquieren tolerancia a la desecación (Parrot, 1993).

La maduración de los embriones somáticos puede ser controlada por tratamientos con ácido absicico (Blochl *et al.*, 2005), sacarosa y desecación (Thomas, 2006); osmóticos y gelificantes (von Aderkas *et al.*, 2002).

Solamente embriones somáticos maduros con una morfología normal; los cuales han acumulado suficientes materiales de reserva y adquirido tolerancia a la desecación al final de la maduración desarrollan en plantas normales (von Arnold., *et al.* 2002).

#### **2.4.1.5. Germinación y conversión de embriones somáticos en plantas**

Al proceso mediante el cual los embriones somáticos emiten brote y raíz se le denomina germinación y al desarrollo de plantas completas en condiciones *ex vitro* se le denomina conversión (Barbón, 2001).

Dentro del proceso de la embriogénesis somática las fases finales lo constituyen la germinación y la conversión de plantas. Las primeras señales de la germinación de los embriones somáticos la constituyen la elongación del hipocótilo, desarrollo del color verde de los cotiledones y la elongación de la radícula (Alemano *et al.*, 1997).

La germinación de los embriones somáticos y su regeneración en plantas ha sido reportada como baja para la mayoría de las especies de plantas (Jayasankar *et al.*, 2001).

Los embriones somáticos usualmente desarrollan en plantas pequeñas, comparables a plántulas, en medio de cultivo sin reguladores del crecimiento. Sin embargo, existen casos donde las auxinas y las citoquininas estimulan la germinación (von Arnold, 2002).

#### **2.4.2. Factores que afectan la embriogénesis somática**

- **Genotipo de la planta**
- **Componentes del medio de cultivo: reguladores del crecimiento**
- **El tipo y el estado fisiológico del explante**
- **Condiciones de cultivo**

##### **2.4.2.1. Genotipo de la planta**

El potencial para la embriogénesis somática está primeramente determinado a nivel de genotipo. Se ha observado que genotipos provenientes de una misma especie, pueden diferir en cuanto a su capacidad de formar embriones somáticos, lo cual está dado por las diferentes habilidades para activar las rutas genéticas (Parrot, 2002). Frecuentemente se ha observado que secciones de callos embriogénicos competentes e incompetentes son producidos en el mismo explante, indicando que incluso células idénticas genéticamente responden de forma diferente a estímulos particulares (Merkle *et al.*, 1995). A pesar del continuo incremento de especies donde las condiciones para la inducción de la embriogénesis somática han sido establecidas, hay un número de especies que son aún recalcitrantes para formar embriones somáticos. Genotipos embriogénicos altamente recalcitrantes existen incluso dentro de una misma especie (Fehér, 2006). Según Raj y Vasil (1995) muchos casos de genotipos recalcitrantes podrían ser resueltos por optimización de las condiciones de cultivo o por una apropiada selección del explante.

##### **2.4.2.2. Componentes del medio de cultivo: reguladores del crecimiento**

Para el desarrollo de la embriogénesis somática generalmente se ha empleado el medio de cultivo MS con algunas modificaciones del mismo.

Los carbohidratos son una fuente de energía para el crecimiento heterotrófico, la sacarosa es usualmente utilizada en el cultivo de tejido en plantas. Sin embargo, la glucosa es el sustrato preferido para algunas especies (Reed y Chang, 1997). La optimización de la sacarosa, junto con otros macronutrientes tales como el nitrógeno pueden tener un profundo efecto en la capacidad de desdiferenciación celular para proliferar *in vitro* (Samoylov *et al.*, 1998). Niveles superóptimos de sacarosa tienen un efecto negativo y son envueltos en síntomas de manifestaciones recalcitrantes asociados a la hiperhidricidad (Zimmerman y Cobb, 1989).

La adición de nitrógeno en el medio de cultivo ha tenido un marcado efecto sobre la embriogénesis somática en varias especies. En particular la relación nitrato-amonio y la adición de nitrógeno reducido en forma de aminoácidos influyen en la aparición de la embriogénesis somática (Nuutila *et al.*, 2002)

#### **2.4.2.2.1 Reguladores del crecimiento**

La presencia de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo es de vital importancia para lograr una reacción morfogénica deseada (Victor y Clement, 2006).

Entre los grupos individuales de los reguladores del crecimiento las auxinas son los agentes más usados para mediar la transición de células somáticas a células embriogénicas (Gaj, 2004). Aunque el proceso de inducción de embriones somáticos a partir de células en cultivo no es completamente entendido, es generalmente aceptada la presencia de cambios diferenciales en la expresión génica de masas de células pro-embriogénicas en presencia continuada de auxina (Linz y Gray, 1995).

Si bien existen casos en los cuales la adición de citoquininas al medio de cultivo como único regulador del crecimiento es efectiva en la inducción de la Embriogénesis somática, este efecto no es universal y su adición a menudo está unida a auxinas para lograr el efecto adecuado (Merkle *et al.*, 1995). Las citoquininas pueden ser esenciales para la maduración y germinación de embriones somáticos. La incorporación de estas durante la fase de histodiferenciación compensa el efecto negativo inducido por la auxina sobre el desarrollo del meristemo (Barbón, 2001).

La adición de ABA en el medio de cultivo induce una reducción en la germinación precoz y un incremento en el número de embriones somáticos maduros. Sin embargo la duración extensiva

de este tratamiento podría influenciar negativamente la conversión de los embriones maduros a plántulas (von Arnold *et al.*, 2002).

Según Parrot (2002), la histodiferenciación, maduración, germinación y conversión de los embriones somáticos de angiospermas ocurre sin la presencia de reguladores del crecimiento exógenos. Este mismo autor señaló que aún así, muchos de los protocolos para la embriogénesis somática que omiten una o más fases, usan reguladores del crecimiento innecesarios, o condiciones subóptimas de cultivo. Lo cual provoca que los embriones somáticos requieran el empleo de reguladores del crecimiento, generalmente citoquinina o giberelina, antes de germinar y convertirse en plantas.

#### **2.4.2.4. El tipo y el estado fisiológico del explante**

La selección del explante podría ser el factor clave que determine el éxito o no de un protocolo de embriogénesis somática (Krishnaraj y Vasil, 1995)

La experiencia en el cultivo de tejidos soporta la idea de que existe un tipo de gradiente en la respuesta embriogénica entre varios órganos de la planta. El potencial embriogénico más alto se presenta en tejidos con origen embriogénico y decrece hacia el hipocótilo, peciolo, hoja y raíz (Neuwman, 2000). La capacidad embriogénica de las células decrece continuamente durante la ontogenia de la planta y es especie dependiente (Fehér, 2005).

#### **2.4.2.5. Condiciones de cultivo**

El ambiente físico influye en el crecimiento y desarrollo morfogénico del tejido *in Vitro* (Nguyen y Kozai, 1998). Los factores más notables son el Dióxido de Carbono, Oxígeno, el etileno, temperatura y humedad relativa. La composición del gas en el frasco de cultivo está influenciada por el volumen del vaso de cultivo y la magnitud de la ventilación. Se estima que los requerimientos de CO<sub>2</sub> que no están implicados en un proceso de fotosíntesis deben estar relacionados con alguna que otra vía metabólica en la biosíntesis de aminoácidos. El proceso de inducción y diferenciación de embriones somáticos está muy vinculado con el comportamiento de el pH del medio de cultivo y la concentración de CO<sub>2</sub> en el frasco de cultivo (Barbón, 2003). Las concentraciones de etileno y compuestos tóxicos (productos de la

oxidación de fenoles) en la fase gaseosa de los frascos de cultivo poseen una tendencia al incremento durante el cultivo (Nguyen y Kozai, 1998). Roustan *et al.* (1990) informan que la adición de inhibidores de etileno, tales como cobalto, níquel y ácido salicílico incrementó la embriogénesis en zanahoria.

De los factores ambientales críticos, el efecto de la luz sobre la embriogénesis somática es uno de los menos estudiados (Hoshino y Joel, 2005). La calidad, intensidad y el fotoperíodo pueden influenciar grandemente la respuesta morfogénica (Michler y Lineberger, 1987); así como estar implicada en el fenómeno de daño por fotooxidación (Benson, 2000).

Los efectos predominantes de la densidad celular sobre la embriogénesis parecen ser más indirectos que directos. La influencia de la densidad celular sobre la embriogénesis es a través de cambios en la concentración de factores celulares, los cuales son literalmente adicionados al medio de cultivo por parte de las células y los embriones. Cambios en la cantidad de nutrientes o gases disponibles por el consumo individual de células o embriones y estrés físico causado por el incremento del contacto físico entre las células y embriones cuando la densidad es incrementada (Higashi *et al.*, 1998).

## **2.5. Proteínas de la embriogénesis**

Los marcadores para la embriogénesis somática ayudan a establecer el potencial embriogénico en células de plantas para obtener una frecuencia de regeneración razonable y proveer información de los mecanismos moleculares de diferenciación celular de las células en plantas. Diferentes experimentos han sido aplicados para aislar y caracterizar marcadores para la embriogénesis somática. En la mayoría de los casos el análisis comparativo de los patrones de proteínas totales de células embriogénicas y no embriogénicas resultó en un gran número de proteínas no específicas haciendo difícil el uso de ellas como marcadores (Hilbert *et al.*, 1992). El desarrollo de células en cluster embriogénicos y posteriormente en embriones somáticos es acompañado por cambios específicos en los patrones de proteínas; nuevas proteínas son sintetizadas, otras disminuyen y desaparecen. Cambios en los patrones de isoenzimas han probado ser una eficiente herramienta para el análisis de diferentes estados en la embriogénesis somática. La expresión de las isoenzimas forma parte de un programa funcional envuelto en la adquisición del potencial embriogénico y su subsecuente diferenciación en embriones.

Hahne G, Mayer JE; Lorz H (1998) Embriogenic and callus specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, *Dactylis glomerata* (L) plant. *Sci* 55:267:279

### **3.0. Materiales y Métodos**

La presente investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV), Santa Clara, durante el período comprendido entre Enero de 2007 a Enero del 2008.

#### **Procedimientos generales**

##### **Instrumental de laboratorio**

Para la manipulación de los explantes en condiciones de asepsia se utilizó una cabina de flujo laminar. Las pinzas y los bisturís se desinfectaron en una solución de NaClO al 1.0% (v/v) durante 15 minutos. Las placas de Petri empleadas en la manipulación del material vegetal fueron esterilizadas en la estufa (Mim, Alemania) a 180°C durante dos horas.

##### **Medios de cultivo**

Los medios de cultivo utilizados en esta investigación se especifican en cada experimento. Los medios de cultivo se dosificaron en frascos de vidrio con una capacidad total de 250 mL, a los que se les adicionaron 30 mL de medio de cultivo. Como agente gelificante para los experimentos se utilizó el Gelrite® (SIGMA) a razón de 2,5 g.L<sup>-1</sup>. El pH de los medios de cultivo fue ajustado antes de la esterilización a 5,8 con soluciones de NaOH y HCl (0,1N). Se realizó la esterilización de los medios de cultivos en autoclave a una temperatura de 121 °C y 1,2 kg.cm<sup>-2</sup> de presión, durante 20 min

## **Condiciones de cultivo**

El material vegetal fue cultivado en condiciones de oscuridad durante las fases de inducción, diferenciación y maduración de los embriones somáticos y a una temperatura de  $27.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ . La fase de germinación se realizó a la luz, para esto se utilizó una cámara de crecimiento de luz solar con una densidad de flujo fotosintético de fotones de  $48.0\text{-}62.5 \mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$  con una duración del período luminoso máximo y mínimo de 13h, 34 min y 10h, 41 min y una temperatura de  $25.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ .

## **Preparación del material vegetal**

Como material vegetal inicial se emplearon secciones de cotiledones de semillas de frutos inmaduros recolectados en el jardín botánico de Villa clara, a partir de plantas adultas de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. seleccionadas por sus características agromorfológicas.

Frutos inmaduros con un largo en el rango de 6.0 -7.5cm de largo y de 4.5-5.5 cm de diámetro, fueron lavados con agua y detergente previo a la desinfección en una solución de NaClO al 3.0% durante 30 min en agitación; a continuación fueron enjuagados dos veces con agua desionizada estéril en condición de asepsia. Las cápsulas fueron seccionadas en dos mitades de las cuales se separó la masa de semilla de la columela. Las semillas fueron descubiertas de su testa y posteriormente los cotiledones desnudos fueron separados y seccionados sus bordes exceptuando la zona donde se encuentra el embrión cigótico.

## **Evaluaciones**

El inicio de la formación de callos, la formación y diferenciación de los embriones somáticos, así como la germinación se realizaron de forma visual. Para las observaciones efectuadas durante la formación y diferenciación de los embriones somáticos se empleó un microscopio estereoscópico marca Leica (modelo WILD M8, Alemania).

## **Procesamiento estadístico**

En todos los experimentos evaluados se realizaron las comprobaciones de normalidad y homogeneidad de la varianza de los datos experimentales obtenidos. Se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis para el procesamiento de los datos obtenidos en la evaluación del efecto de 2,4-D en la inducción y formación de callo. Para el resto de los experimentos, los datos fueron procesados estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple y la diferencia entre los tratamientos se determinó con la aplicación de la prueba de rangos múltiples de Duncan. El paquete estadístico empleado en el procesamiento de todos los datos fue SPSS versión 13.0.

### **3.1. Inducción y formación de callo en *Swietenia mahagoni* (L.)Jacq**

#### **3.1.1. Efecto de 2,4-D y la kinetina en la inducción y formación de callo.**

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la combinación auxina-citoquinina en la inducción de la embriogénesis somática indirecta, específicamente en la inducción y formación de callo. Se empleó como explante

inicial secciones de cotiledones, las cuales se colocaron en un medio de cultivo compuesto por las sales MS suplementado con 200.0 mg.L<sup>-1</sup> de L-glutamina, 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de piridoxina, 100.0 mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada, 40.0 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y gelificado con 2.5 g.L<sup>-1</sup> de Gelrite (SIGMA). Se estudiaron tres concentraciones de 2,4-D (2.0, 4.0 y 6.0 mg.L<sup>-1</sup>) combinado con 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de kinetina.

Se colocaron cuatro secciones cotiledonares por frasco de cultivo. Cada tratamiento estuvo compuesto por 25 réplicas. Se empleó un diseño completamente aleatorizado y el experimento se realizó dos veces en el tiempo. Se realizaron observaciones semanales para determinar el inicio de la formación de callos hasta su presencia en la mayoría de los explantes. A las ocho semanas se evaluó el número de explantes que formaron callos.

### **3.2. Formación y diferenciación de embriones somáticos de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.**

#### **3.2.1. Influencia del 6-Bencilaminopurina (6-BAP) en la formación y diferenciación de embriones somáticos.**

Este experimento se realizó con el objetivo evaluar diferentes concentraciones de 6-BAP en el proceso de formación y diferenciación de embriones somáticos. Se estudiaron diferentes concentraciones de 6-BAP (2.0, 4.0 y 6.0 mg.L<sup>-1</sup>) y un control (Medio de cultivo sin reguladores de crecimiento). Se tomaron los callos

formados en el mejor tratamiento del acápite 3.1. El medio de cultivo estuvo constituido por sales MS, al que se le adicionaron  $5.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de tiamina,  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido nicotínico,  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de piridoxina,  $200.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de L-glutamina,  $50.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de cisteína,  $100.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de mio-inositol,  $30.0 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarosa y  $2.5 \text{ g.L}^{-1}$  de Gelrite (SIGMA).

Cada tratamiento estuvo compuesto por diez réplicas. Se colocaron cuatro callos por frasco de cultivo. El diseño experimental fue completamente aleatorizado. Las observaciones se realizaron cada 15 días para detectar la aparición de embriogénesis somática indirecta. Transcurridas diez semanas de cultivo se evaluó el experimento.

Las variables evaluadas fueron:

- Número de callos con embriones somáticos
- Número de callos con ESAF
- Número de callos con ESBF
- Número total de embriones somáticos por callo con ESBF y clasificación por etapa de desarrollo

### **3.4. Maduración y germinación de los embriones somáticos *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.**

#### **Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP en la germinación de los embriones somáticos.**

El objetivo de este experimento fue evaluar la influencia del 6-BAP en la germinación de embriones somáticos. Se emplearon embriones somáticos en etapa cotiledonal procedentes de la fase de formación y diferenciación; estos fueron transferidos a un medio de cultivo de germinación constituido por la mitad de las sales MS y suplementado con 500.0 mg.L<sup>-1</sup> de L- glutamina, 20.0 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y 2.5 g. L<sup>-1</sup> de Gelrite (SIGMA).

Se estudiaron diferentes concentraciones de 6-BAP (0.125, 0.25 y 0.50 mg.L<sup>-1</sup>) y un control sin reguladores de crecimiento. Para cada tratamiento se emplearon diez réplicas (frascos de cultivo) y cada réplica con cinco embriones somáticos. Se evaluaron a los 30 días de cultivo las siguientes variables:

- Embriones somáticos con germinación total
- Embriones somáticos con germinación parcial
- Embriones somáticos con síntomas de hiperhidricidad
- Embriogénesis somática secundaria

## **Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en la maduración y germinación de embriones somáticos.**

El objetivo de este experimento fue evaluar la necesidad de una fase de maduración previa para incrementar el porcentaje de germinación de los embriones somáticos. Primeramente se colocaron embriones somáticos en etapa cotiledonal en un medio de maduración, el cual estaba constituido por la mitad de las sales MS, 500 mg.L<sup>-1</sup> de L-glutamina, 30.0 g.L<sup>-1</sup> sacarosa, 2.5 g.L<sup>-1</sup> de Gelrite (SIGMA). Cada tratamiento contó con ocho réplicas y cinco embriones somáticos por frasco. Se evaluaron tres concentraciones de sorbitol (20.0, 40.0 y 60.0 g. L<sup>-1</sup>). A los 30 días de cultivo, se colocaron los embriones somáticos en el mejor medio de cultivo de germinación del experimento anterior y en un control sin reguladores del crecimiento. El medio de cultivo estuvo constituido por la mitad de las sales MS, vitaminas MS 10 ml.L<sup>-1</sup> y 20.0 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa. Además se evaluó la germinación embriones sin madurar en el mejor tratamiento del acápite anterior.

Se evaluaron a los 30 días de cultivo las siguientes variables:

Embriones somáticos con germinación total

Embriones somáticos con germinación parcial

Embriones somáticos con síntomas de hiperhidricidad

Embriogénesis somática secundaria

#### **4.1. Inducción y formación de callo en *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq**

##### **4.1.1. Efecto de 2,4-D y la kinetina en la inducción y formación de callo.**

Durante la fase de inducción y formación de callos, se observó que a los 15 días de cultivo, los explantes manifestaron cambios morfológicos. En los bordes seccionados de los cotiledones se observó un engrosamiento y la presencia de pequeñas callosidades (Figura 1).



Figura 1. Sección cotiledonal de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. con presencia de callosidad en los bordes seccionados a los 15 días de cultivo.

En la cuarta semana de cultivo se observó la presencia de callo en los bordes de los explantes y en la octava semana de cultivo los callos habían cubierto la totalidad de la superficie del explante. La mayoría de los callos formados mostraron cambios en su apariencia y coloración durante el tiempo de cultivo. Al comienzo, los callos, poseían una coloración blanca que durante el transcurso del tiempo de cultivo se modificó. A la octava semana de cultivo, los callos presentaban una coloración pardo oscura, apariencia no acuosa y características nodulares. Estas características de los callos se observó en todos los tratamientos evaluados (Figura 2).



Figura 2. Callo de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. formado a partir de una sección cotiledonal a las ocho semanas de cultivo.

Los resultados obtenidos muestran un incremento en la respuesta morfológica de los explantes en cuanto a la formación de callo, lo cual estuvo relacionado con el aumento de la concentración de 2,4-D por tratamiento. El mayor número de explantes con callos se presentó en el tratamiento con 6.0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de Kinetina con diferencias significativas con los otros tratamientos (2.0 y 4.0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D) (Tabla1).

Tabla 1. Efecto de diferentes combinaciones de 2,4-D y kinetina en la formación de callo a partir de secciones cotiledonales en *Swietenia Mahagoni* (L.) Jacq. a las ocho semanas de cultivo.

Tratamientos	No. explantes con callos /frasco	Porcentaje (%)
2.0 mg.l <sup>-1</sup> 2,4-D + 1.0 mg.L <sup>-1</sup> Kinetina	3.32 b	66.82
4.0 mg.l <sup>-1</sup> 2,4-D + 1.0 mg.L <sup>-1</sup> Kinetina	3.58 b	79.51
6.0 mg.l <sup>-1</sup> 2,4-D + 1.0 mg.L <sup>-1</sup> Kinetina	4.01 a	95.30

Rangos medios con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticaente según la prueba de Kruscall Wallis

Similares resultados fueron obtenidos por Collado (2006), el cual obtuvo los mayores números de explantes con callo en *Swietenia macrophylla* con las concentraciones de 4.0 y 6.0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D combinadas con 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de kinetina. Mientras que, Cruz da Rocha y Quoirin (2004) al estudiar el efecto y

concentración de diferentes reguladores del crecimiento en la inducción y formación de callos, a partir de segmentos de hojas y raíces de *Swietenia macrophylla*, obtuvieron mejores resultados al combinar ANA con 6-BAP y no al emplear esta auxina con kinetina en el medio de cultivo. Medina y Sotolongo (2004) lograron un mayor número de explantes con callos en el híbrido de caoba (*Swietenia macrophylla* king X *Swietenia mahagoni* (L.)Jacq.) a partir de folíolos de rebrotes, cuando adicionaron al medio de cultivo los reguladores del crecimiento 2,4-D, AIB y Kinetina. Abdul *et al.* (2005) obtuvieron formación de callos en la especie *Gossypium Spp.* en un medio de cultivo suplementado con 0.1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de kinetina.

Con los resultados obtenidos se demostró que a una concentración de 6.0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D y 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de Kinetina se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a formación de callos en *Swietenia mahagoni* a partir de secciones cotiledonales.

## **4.2. Formación y diferenciación de embriones somáticos de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.**

### **4.2.1. Influencia del 6-Bencilaminopurina (6-BAP) en la formación y diferenciación de embriones somáticos.**

A los 28 días de cultivo, en los callos colocados en el medio de cultivo para la formación y diferenciación de los embriones somáticos, se observó en los diferentes tratamientos la presencia de estructuras embriogénicas de color blanco-amarillenta (Figura 3).



Figura 3. Callo con estructuras embriogénica de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. a los 28 días de cultivo.

Posteriormente se evidenció la presencia de embriogénesis somática de alta y baja frecuencia en los callos. El desarrollo de ambas embriogénesis somáticas pudo observarse sobre un mismo callo o en callos diferentes.

Con respecto al número de callos con embriogénesis somática, se determinó que el mejor tratamiento fue donde se aplicó al medio de cultivo con una concentración de 4.0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP, esta variante manifestó diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP en el desarrollo de la embriogénesis somática indirecta de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. a las nueve semanas de cultivo

Tratamientos	No. explantes con embriogénesis somática/frasco	Porcentaje (%)
Control	1.0 c	25.0
2.0 mg.L <sup>-1</sup> 6-BAP	2.1 bc	52.5
4.0 mg.L <sup>-1</sup> 6-BAP	3.6 a	90.0
6.0 mg.L <sup>-1</sup> 6-BAP	2.3 b	57.0
E.E.	±0.17	

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente para (p<0.05) según las pruebas de Duncan.

La embriogénesis somática de baja frecuencia en los explantes se caracterizó por ser asincrónica; los embriones somáticos se encontraban en diferentes etapas de

desarrollo (globular, torpedo y cotiledonal) (Figura 4A). Los explantes con embriogénesis somática de alta frecuencia presentaron proembriones o embriones somáticos en etapa globular (Figura 4B).

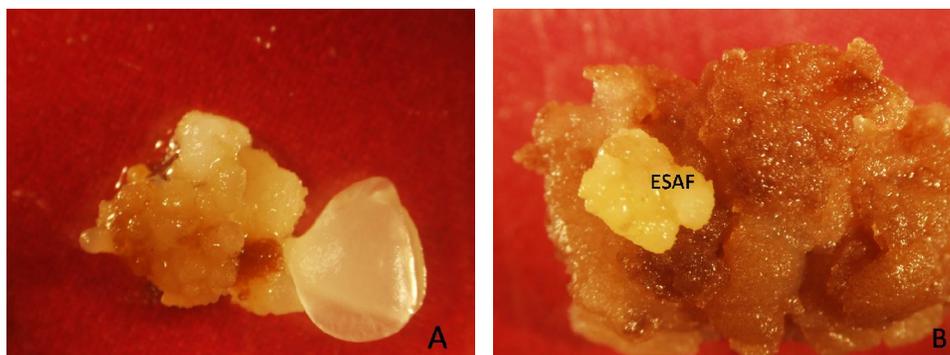


Figura 4. Callo de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. con ESBF (A) y ESAF (B) a los 42 días de cultivo.

El tratamiento con  $4.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-BAP resultó ser también la variante donde se obtuvieron el mayor número de callos con ESAF y ESBF siendo diferente significativamente con el resto de los tratamientos (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP en el desarrollo de la embriogénesis somática indirecta de alta y baja frecuencia de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. a las nueve semanas de cultivo

Tratamientos	Callo con ESAF		Callo con ESBF	
	No. de callo/frasco	Porcentaje (%)	No. de callo/frasco	Porcentaje (%)
Control	0.4 c	10.0	0.8 c	20.0
$2.0 \text{ mg.L}^{-1}$ 6-BAP	0.7 b	17.5	1.9 b	47.0
$4.0 \text{ mg.L}^{-1}$ 6-BAP	2.2 a	55.0	3.7 a	92.0
$6.0 \text{ mg.L}^{-1}$ 6-BAP	1.5 b	37.0	2.0 b	50.0
$\pm$ E.E	$\pm 0.11$		$\pm 0.14$	

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente para ( $p < 0.05$ ) según la prueba de Duncan.

Al comparar los resultados se encontró que el 6-BAP a las concentraciones empleadas estimuló la embriogénesis somática indirecta, tanto de baja como de alta frecuencia (Figura 5); aunque este proceso también se manifestó sin el efecto

inductor de este regulador del crecimiento o sea se observó en el control sin reguladores del crecimiento.

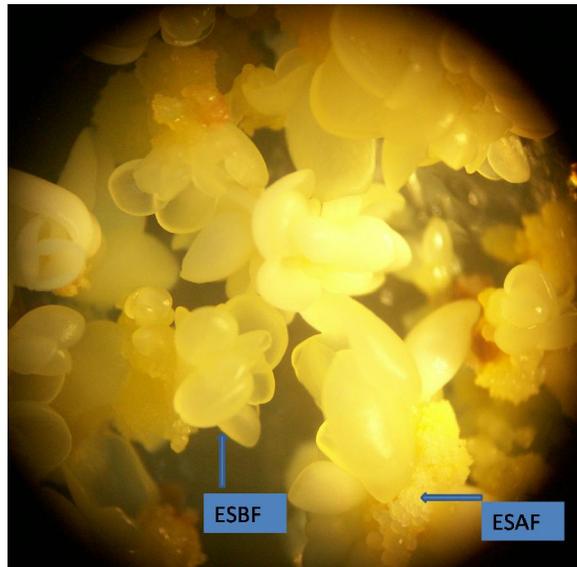


Figura 5. Embriogénesis somática indirecta de baja y alta frecuencia observada en callo de *Swietenia mahagoni* (L.)Jacq (100x)

Autores como Collado (2006), Giagnacovo *et al.* (2001) y Salvi *et al.* (2001) han empleado el 6-BAP en la formación y diferenciación de embriones somáticos a partir de callos en las especies *Swietenia Macrophylla*, *Azadirachta excelsa* y *Azadirachta indica* respectivamente. Los resultados obtenidos fueron similares a la de estos autores, aunque lograron el desarrollo de embriones somáticos al utilizar como regulador del crecimiento el 6-BAP; sin embargo, estos autores lograron un mayor número de embriones somáticos con una concentración de  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  6-BAP. Según Sharma *et al.* (2005) el efecto de las citoquininas en la inducción y desarrollo de embriones somáticos puede depender del genotipo y la presencia o ausencia de otros reguladores del crecimiento.

Se observó que el mayor número de embriones somáticos en los callos con ESBF se manifestó en la variante con 4.0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP, la cual mostró diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP sobre el número de embriones somáticos por callos de *Swietenia mahagoni* (L.)Jacq. a las nueve semanas de cultivo.

Tratamientos	No. Embriones somáticos /callos con ESBF
Control	10.0 d
2.0 mg.L <sup>-1</sup> 6-BAP	22.0 c
4.0 mg.L <sup>-1</sup> 6-BAP	36.7 a
6.0 mg.L <sup>-1</sup> 6-BAP	27.1 b
± E.E.	± 0.43

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente para (p<0.05) según las pruebas de Duncan.

De los embriones somáticos formados en los callos con ESBF, fue también en el tratamiento con 4.0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP donde se mostró los mayores valores en cuanto a número de embriones somáticos en etapa globular, torpedo y cotiledonal, con diferencias respecto al resto de las variantes (Tabla 5). Los embriones somáticos pudieron ser individualizados del callo con facilidad (Figura 6).

Tabla 5. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP sobre número de embriones somáticos de *Swietenia mahagoni* (L.)Jacq en diferentes etapas de desarrollo formados en callos con ESBF.

Tratamientos	Etapa globular	Etapa torpedo	Etapa cotiledonal
	No.ES/Callo	No.ES/Callo	No.ES/Callo
Control	3.4 d	1.9 c	4.7 d
2.0 mg.L <sup>-1</sup> 6-BAP	6.9 c	4.0 b	11.1 c
4.0 mg.L <sup>-1</sup> 6-BAP	12.7 a	5.7 a	18.3 a
6.0 mg.L <sup>-1</sup> 6-BAP	10.2 b	5.4 a	11.5 b
E.E	±0.19	± 0.16	± 0.25

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente para (p<0.05) según las pruebas de Duncan.

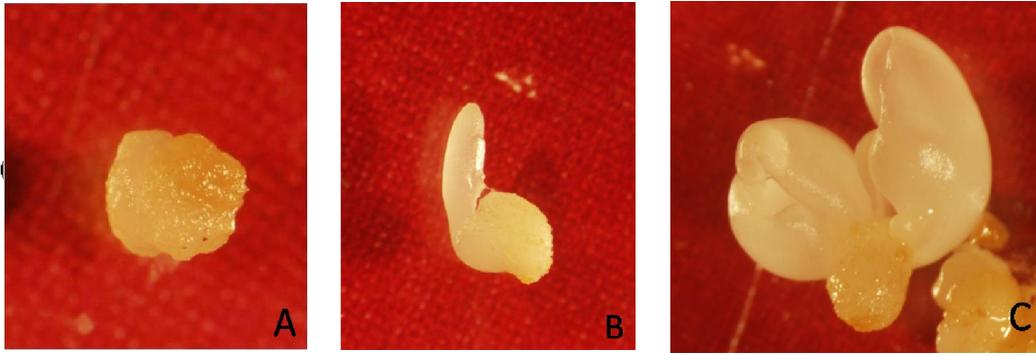


Figura 6. Embriones somático de *Swietenia mahagoni* (L.)Jacq en diferentes etapas de desarrollo (A. Etapa Globular, B. Etapa de Torpedo, C. Etapa Cotiledonal).

Similares resultados se ha observado otras especies leñosas como en *Mangifera indica* L. cv. *Amrapali*. En esta especie, un aumento en la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo se correspondió con incrementos significativos en la producción de embriones somáticos, así como también en el número de los embriones somáticos que pasaron de la etapa globular a torpedo (Laxmi *et al.*, 1999).

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que el 6-BAP estimuló la formación y diferenciación de embriones somáticos a partir de callos de *Swietenia mahagoni*. Con una concentración de este regulador del crecimiento de  $4.0 \text{ mg.L}^{-1}$  se produce la aparición de callos con embriogénesis somáticas tanto de alta frecuencia como de baja frecuencia, así como el número y desarrollo de los embriones somáticos en los callos con embriogénesis somática de baja frecuencia.

#### 4.4. Maduración y germinación de los embriones somáticos *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.

##### *Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP en la germinación de los embriones somáticos.*

Los resultados obtenidos indican que el mejor tratamiento en la germinación completa y parcial de los embriones somáticos se observó cuando se aplicó al medio de cultivo 0.25 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP, esta variante presentó diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos tanto para la germinación completa como la parcial (Tabla 5). Aunque la supervivencia de los embriones somáticos no fue afectada en ninguno de los tratamientos evaluados.

Tabla 5. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP en la germinación de embriones somáticos de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq a los 30 días de cultivo

Tratamientos	Germinación completa de ES		Germinación parcial ES	
	No.de ES/frasco	Porcentaje (%)	No.de ES/frasco	Porcentaje (%)
Control	0.2 b	4.0	0.4 b	8.0
0.125 mg.L <sup>-1</sup> 6- BAP	0.4 b	8.0	0.5 b	11.0
0.25 mg.L <sup>-1</sup> 6- BAP	1.1 a	22.0	1.4 a	29.0
0.50 mg.L <sup>-1</sup> 6- BAP	0.1 b	2.0	0.7 b	14.0
E.E	±0.08		±0.11	

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente para (p<0.05) según las pruebas de Duncan.

Se observó, que el 6-BAP a una concentración de 0.25 mg.L<sup>-1</sup> estimuló tanto la germinación completa como la parcial. Estos resultados coinciden con lo planteado por Barbón *et al.* (2002), Vilchez *et al.* (2004), von Arnold *et al.* (2002) y Sharma *et al.* (2005), estos autores definieron que la adición del 6-BAP al medio de cultivo incrementa la germinación de los embriones somáticos.

Un fenómeno observado en los diferentes tratamientos fue la aparición de embriones somáticos con síntomas de hiperhidricidad. Los embriones somáticos hiperhídricos mostraron un aspecto traslúcido, fueron poco resistentes a la manipulación y las hojas cotiledonales y raíces presentaban engrosamiento, algo deformadas y de apariencia vítrea.

Al comparar los resultados se observó un mayor número de embriones somáticos hiperhídricos en las variantes con 0.25 mg.L<sup>-1</sup> y 0.50 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP, con diferencias significativas con respecto al control (Tabla 6).

Autores como Franck *et al.* (2004), Kevers *et al.* (2003) y Saher *et al.* (2003) definieron que una de las posibles causas de la hiperhidricidad podría ser un inusual tratamiento con reguladores del crecimiento, principalmente altas concentraciones de citoquinina.

En todos los tratamientos evaluados se observaron embriones somáticos con embriogénesis somática secundaria. Los tratamientos con 0.25 mg.L<sup>-1</sup> y 0.50 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP mostraron el mayor número de embriones somáticos con embriogénesis secundaria, con diferencias significativas con el resto de las variantes (Tabla 6).

Tabla 6. Número de embriones somáticos que desarrollaron síntomas de hiperhidricidad y embriogénesis secundaria en *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.

Tratamientos	Hiperhidricidad		Embriogénesis secundaria	
	No.de ES/frasco	Porcentaje (%)	No.de ES/frasco	Porcentaje (%)
Control	1.8 b	36.0	0.7 b	14.0
0.125 mg.L <sup>-1</sup> 6- BAP	2.5 ab	50.0	0.5 b	10.0
0.25 mg.L <sup>-1</sup> 6- BAP	4.0 a	80.0	1.9 a	38.0
0.50 mg.L <sup>-1</sup> 6- BAP	4.4 a	88.0	1.8 a	30.0
E.E	±0.25		±0.16	

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente para (p<0.05) según las pruebas de Duncan.

Un comportamiento similar fue observado en embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* por Collado (2006), donde los embriones somáticos en contacto con 6-BAP se multiplicaron e incrementaron los valores de embriogénesis secundaria a medida que hubo un incremento en la concentración de este regulador del crecimiento. Da silva *et al.* (2005) obtuvieron el mayor número de embriones somáticos con embriogénesis secundaria cuando cultivaron en medio de cultivo líquido embriones somáticos de *Coffea arabica* cv. Catimor suplementado con 26.6 uM de 6-BAP. Según Parrott (2002) existen especies donde la embriogénesis secundaria o repetitiva pudiera ocurrir en ausencia de toda auxina externa y que este ciclo puede ser difícil de romper. También señalan que los embriones somáticos están formados por células embriogénicas predeterminadas que al ponerse en contacto con una citoquinina, pueden dividirse de forma independiente y formar otros embriones somáticos.

***Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en la maduración y germinación de embriones somáticos.***

Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo del número de embriones somáticos con germinación total y parcial procedentes de tratamientos de maduración con 4.0% y 6.0 % de sorbitol en relación al control y a los embriones somáticos madurados con 2.0% de sorbitol. El mayor porcentaje de germinación completa y parcial con diferencias significativas al resto de los tratamientos se observó cuando embriones somáticos madurados con 4.0% y 6.0 %

de sorbitol fueron germinados en un medio de cultivo suplementado con 0.25 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP (Tabla 7 y Figura 7).

Tabla 7. Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en la germinación completa y parcial de los embriones somáticos de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.

Tratamientos	Germinación Completa		Germinación parcial	
	No.ES/frasco	Porcentaje (%)	No.ES/frasco	Porcentaje (%)
A	1.0 c	20.0	1.1 d	22.0
B	0.8 c	16.0	1.2 c	24.0
C	3.6 a	72.0	2.7 a	54.0
D	3.4 a	68.0	3.0 a	60.0
E	1.0 c	20.0	0.9 d	18.0
F	1.9 b	38.0	2.0 b	40.0
G	2.3 b	46.0	2.1 b	42.0
± EE	± 0.09		± 0.11	

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente para (p<0.05) según las pruebas de Duncan.

Tratamientos:

A- Control 0.25 mg.L<sup>-1</sup> 6-BAP

B- Maduración con 2.0% Sorbitol y germinación en 0.25 mg.L<sup>-1</sup> 6-BAP

C- Maduración con 4.0% Sorbitol y germinación en 0.25 mg.L<sup>-1</sup> 6-BAP

D- Maduración con 6.0% Sorbitol y germinación en 0.25 mg.L<sup>-1</sup> 6-BAP

E- Maduración con 2.0% Sorbitol

F- Maduración con 4.0% Sorbitol

G- Maduración con 6.0% Sorbitol



Figura 7. Embriones somáticos con germinación completa y parcial de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. a los 30 días de cultivo en medio de cultivo de germinación.

Con los resultados obtenidos se demostró que el cultivo de embriones somáticos en un medio de cultivo para la maduración con 4.0% y 6.0 % de sorbitol es necesario para incrementar el número de embriones somáticos germinados en la especie

*Swietenia mahagoni*. En cuanto al empleo del 6-BAP en la germinación se demostró que su adición al medio de cultivo incrementa significativamente los porcentajes de germinación completa y parcial de los embriones somáticos de la especie *Swietenia mahagoni*

Autores como Collado *et al.* (2007) obtuvieron en la germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* resultados similares a los presentados; pero utilizaron la 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. García *et al.* (2001) señalaron que el uso del manitol en la maduración resultó tener una eficiencia similar a la sacarosa para la germinación de embriones somáticos de la especie *Olea europaea*.

Ha sido reportado por otros autores la aplicación del 6-BAP en la germinación de embriones somáticos. Capuana *et al.* (2007), lograron una mejor germinación de embriones somáticos con emisión del hipocótilo y abertura completa de los cotiledones cuando suplementaron el medio de cultivo con 0.44  $\mu\text{M}$  de 6-BAP en la especie *Fraxinus excelsior* (L.). Similar comportamiento observaron Vilchez *et al.* (2001), estos autores lograron en embriones somáticos de *Psidium guajava* L. un 82.0% de germinación con el empleo de 6-BAP combinado con un análogo del brasinoesteroides (Bíobras 6) en concentraciones de 0.25  $\text{mg.L}^{-1}$  y 10.0  $\text{mg.L}^{-1}$  respectivamente, bajo condiciones de luz solar. Sin embargo Collado *et al.* (2006) señalaron que para *Swietenia macrophylla* un aumento de las concentraciones de 6-BAP en el medio de cultivo afectaron negativamente la germinación de los

embriones somáticos y sus mejores resultados lo obtuvieron en un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento.

En cuanto a la expresión de síntomas de hiperhidricidad el tratamiento con 0.25 mg.L<sup>-1</sup> 6-BAP con embriones somáticos sin madurar expresó diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 8). Por lo que se podría concluir 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 cuando embriones somáticos fueron colocados a germinar en un medio de cultivo con 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP sin previa maduración, este tratamiento mostró diferencias significativas con las demás variantes (Tabla 8 y Figura 8). Una menor embriogénesis secundaria, con diferencias significativas al resto de los tratamientos, se observó en los embriones somáticos madurados en 4.0% y 6.0% de sorbitol y posteriormente germinados en un medio de cultivo sin adición de 6-BAP.

Tabla 8 .Efecto de diferentes concentraciones de sorbitol en la expresión de síntomas de hiperhidricidad y la embriogénesis secundaria de los embriones somáticos de *Swietenia mahagoni* (L.)Jacq. a los 30 días de cultivo

Tratamientos	Hiperhidricidad		Embriogénesis secundaria	
	No.ES/frasco	Porcentaje (%)	No.ES/frasco	Porcentaje (%)
A	4.0 a	80.0	1.5 a	30.0
B	2.6 b	52.0	0.4 b	8.0
C	1.3 c	26.0	0.4 b	8.0
D	1.3 c	26.0	0.2 bc	4.0
E	1.4 c	28.0	0.3 bc	6.0
F	0.4 c	8.0	0.1 c	2.0
G	0.2 c	4.0	0.1 c	2.0
±EE	± 0.14		± 0.08	

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente para (p<0.05) según las pruebas de Duncan.

Tratamientos:

A- Control 0.25 mg.L<sup>-1</sup> 6-BAP

B- Maduración con 2.0% Sorbitol y germinación en 0.25 mg.L<sup>-1</sup> 6-BAP

- C- Maduración con 4.0% Sorbitol y germinación en 0.25 mg.L<sup>-1</sup> 6-BAP
- D- Maduración con 6.0% Sorbitol y germinación en 0.25 mg.L<sup>-1</sup> 6-BAP
- E- Maduración con 2.0% Sorbitol
- F- Maduración con 4.0% Sorbitol
- G- Maduración con 6.0% Sorbitol

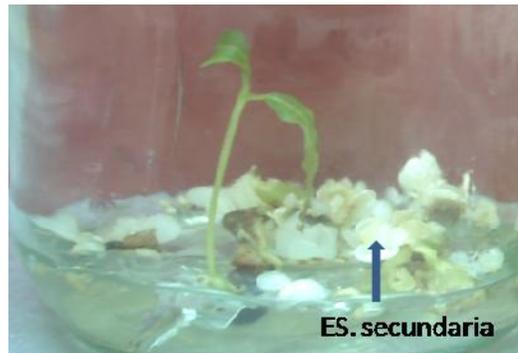


Figura 8. Embriones somáticos germinados y con embriogénesis somática secundaria de *Swietenia mahagoni* (L.)Jacq. a los 30 días de cultivo

Estos resultados nos demostraron que los embriones somáticos madurados a altas concentraciones de sorbitol alcanzaron etapas superiores de desarrollo y que la adición de 6-BAP al medio de cultivo para la germinación incrementó la expresión de la embriogénesis secundaria.

Resultados similares se obtuvieron en la germinación de embriones somáticos de la especie *Swietenia macrophylla*, 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. Un comportamiento similar fue reportado para la especie leñosa *Quercus robur* L.(Cuenca *et al.* (1999) y Zegzouti *et al.* (2001), mencionaron que con el aumento del estado de madurez de los embriones somáticos, hubo una disminución de la embriogénesis somática secundaria.

## 5. Conclusiones

- Se obtuvo el mayor porcentaje de formación de callo (95.30%) a partir de secciones cotiledonales al emplearse una concentración de  $6.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D combinado con  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de Kinetina en el medio de cultivo.
- Se logró una mayor formación y diferenciación de embriones somáticos (36.7%) con una concentración de  $4.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-BAP, con la cual se obtuvieron los mayores porcentajes (55.0% y 92.0%) de ESAF y ESBF, así como el mayor número de embriones somáticos en etapa globular, torpedo y cotiledonal.
- Es necesaria una fase de maduración con 4.0% y 6.0% de sorbitol para incrementar el porcentaje de germinación de los embriones somáticos.
- Los mayores porcentajes de germinación completa (72.0% y 82.8%) y parcial (54.0% y 60.0%) se lograron en un medio de cultivo suplementado con  $0.25 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-BAP, con embriones somáticos madurados en medio de cultivo con 4.0% y 6.0% de sorbitol.

## **6. Recomendaciones**

- Evaluar otras concentraciones de 2,4-D para la fase de inducción y formación de callo.
- Estudiar otros tipos de explantes inicial para el proceso de embriogénesis somática.
- Estudio de la fase de conversión de los embriones somáticos germinados.
- Realizar estudios básicos del proceso de embriogénesis somática.

## 7. Referencias bibliográficas

- Alemano, L, Berthouly M y Micaux-Ferreiere N (1997) Embriogenesis somatique ducacaoyer a partir de pieces florales. *Plantation Recherche Dvelopment* 3:225-237
- Altman, A y Loberant B (1998) Micropropagation. Clonal plant propagation *in vitro*. *Agricultural Biotechnonology* 8:19-42
- Aly, MAM, Rathinasabapathi B y Kelley K (2002) Somatic embryogenesis in perennial statice *Limonium bellidifolium*, plumbaginaceae. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 68: 127-135
- Baill, TD, Kim V, Anbazhagan R y Park JI (2005) Somatic Embryogenesis in *Schisandra chinensis* (Turcz.) *In Vitro Cell* 41:253-257
- Barbón, R (2001) Efecto del dióxido de carbono sobre, la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo y *Clementis tangutica* K. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor. Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Barbón, R, Jiménez E, De feria M, Quiala E, Capote A y Chavez M (2002) Influencia del genotipo y la densidad de inoculación sobre la diferenciación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L.cv.Caturra rojo y *Coffea canephora* cv. Robusta. *Biotecnología Vegetal* 3: 145-148
- Barbón, R (2003) Aspectos relacionados con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal* 3(4):211-221

- Benson, EE (2000) Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant* 36:163–17
- Betancourt, A (1999) *Silvicultura Especial de Árboles Maderables*. Editorial Científico-técnica. La Habana pp. 323-331
- Bisse, J (1998) *Árboles de Cuba*. Editorial Científico-Técnica. La Habana pp.217-218
- Blochl, A, March GG, Sourdioux M, Peterbauer T y Richter A (2005). Induction of raffinose oligosaccharide biosynthesis by abscisic acid in somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa*L.) *Plant Sci.* 168: 1075-1082
- Campbell, MM, Bruner AM, Jones HM y Strauss SH (2003) Forestry's fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees. *Plant Biotechnology journal* 1:141-154
- Capuana, M, Petrini G, Di Marco A y Giannini R (2007) Plant regeneration of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) by somatic embryogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*43:101-110
- Collado, R, 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 embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* King *Biología Vegetal* 7(1): 35-39
- Cruz da Rocha, S y Quorin M (2004) Calogenenses e Rizogenenses em Explantes de Mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in Vitro*. *Ciencias Forestal, Santa Maria* 14:91-101

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

-Da Cunha, SL, Alves OL, Luces GF, Cravo RN y Pereira JP (2001) Enraizamiento *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* King.) CERNE (7) 1:124-128

-Fehér, A, Pasternak TP y Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell Tiss. Organ Cult 74:201–228

-Fehér, A (2005) Why somatic plant cell start to form embryos? En: Mujib, A y Samaj J (eds.) Somatic Embriogénesis, pp. 85-97

-Fernández, DR, Hermoso GL y Menéndez YA (2005) Primary and secondary embriogénesis in leaf sections and cells suspentions off *Coffea Arabica* CV.CATIMOR. Interciencia (30) 11:694-698 pp.

-Filonova L, Bozhkov P y von Arnold S (2000) Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. J. Exp. Bot. 51: 249–264

-Francis, JK (1991) *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. West Indies mahagoni.SO-ITF-SM-46.New Orleans, LA: U .S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station p. 7

-Franck, T, Kevers C, Gaspar T, Dommes J, Deby C, Greimers R, Serteyn D, Deby-Dupont G (2004) Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on

- gelrite: a controlled stress response. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 519–527
- Freire, SM (2003) Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biología Vegetal* (3) 4: 195-209
- Fuentes, SRL, Calheiros MBP, Manetti-Filho J y Vieira LGE (2000) The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 60: 5-13
- Gaj, MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis Thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul* 43:27-47
- Garcia, JL, Troncoso J, Sarmiento R y Troncoso A (2002) Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 95–100
- Giagnacovo, G, Pascua G, Monacelli B, Van S, Maccioni O y Vitali F (2001) organogenesis y embryogenesis from callus cultures of *Azadirachta excelsa*. *Plant-biosystems* 135:13-18
- Gómez, R (1998) Generalidades sobre la embriogénesis somática. Resúmenes del curso Internacional de Propagación Masiva in Vitro de especies vegetales. Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara. Cuba.
- Häggman, H, Vyosker J, Sarjala T, Jokela A y Niemi C (2005) Somatic Embryogenesis of Pine Species from Functional Genomics to Plantation Forestry. En: Mujib, A y Samaj J(eds.) *Somatic Embriogénesis* pp. 119-140

- Higashi, K, Daita M, Kobayashi T, Saki K, Harada y Kamada H (1998) Inhibitory conditions for carrot somatic embryogenesis in high-cell-density cultures. *Plant Cell* 18:2-6
- Hoshino, T y Cuello JL (2005) Environmental Design Considerations for Somatic Embryogenesis. En: Mujib, A y Samaj J (eds.) *Somatic Embryogenesis* 25-32
- Jayasankar, S, van Aman M, Li Z y Gray DJ (2001) Direct seeding of grapevine somatic embryos and regeneration of plants. *In Vitro Cell Dev Biol.* 37: 476-479
- Jiménez, VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 13(2):196-223
- Liu-M, Xu ZH y Chua N-H (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5:621-630
- Kevers C, Gasper T y Dommes J (2002) The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 70: 181-188
- Kevers, C, Franck T, Strasser RJ, Dommes J y Gaspar T (2003) Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 181–191
- Krihna Raj, S y Vasil IK (1995) Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. En: Thorpe TA (ed.) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer, Dordrech pp. 417-470

- Laxmi, DV, Sharma HC, Kirti PB y Mohan ML (1999) Somatic embryogenesis in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Amrapali: Plant Tissue Culture Division, National Chemical Laboratory, Pune 411 008, India
- Litz, RE y Gray DJ (1995) Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11:416-425
- Medina, M y Sotolongo R (2004) Avances en el cultivo de tejidos de *Swietenia macrophylla* King. *X Swietenia Mahagoni* (L) Jacq. *Revista Forestal Baracoa* (2) 23:19-26
- Merkle, SA, Parrott WA y Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe, TA (Ed.) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers pp. 155-203.
- Merkle, S, Parrot W y Flinn B (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis .En: Thorpe, TA (Eds.) *in vitro embryogenesis in plants* pp.155-203 Kluwer Academic Publisher. Netherlands.
- Merkle, S y Dean J (2000) Forest tree biotechnology. *Current Opinion Biotechnology* 11:298–302
- Merkle, SA y Trigiano RN (1992) *In vitro* propagation of hardwoods. En: *Applications of Vegetative Propagation in Forestry; Proceedings of the SRIEG Biennial Symposium on Forest Genetics: 8–10; Huntsville, AL*. Edited by Foster GS, Diner AM. New Orleans, LA: USDA Forest Service General Technical Report SO-108: Southern Forest Experiment Station pp.23-37.

- Michler, CH y Lineberger R D (1987) Effects of light on somatic embryo development and abscisic acid levels in carrot suspension cultures. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 11:189–207
- Mordhorst, AP, Toonen MAJ y De Vries SC (1997) Plant embryogenesis. *Critical Reviews. Plant Sciences* 16:535-576
- Newman, KH (2000) Some studies on somatic embryogenesis: A tool in plant biotechnology
- Nguyen QT, Kozai T (1998) Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Environ. Control. Biol* 36(2):59-75
- Nuutila, A, Villiger C y Oksman K (2002) Embryogenesis and regeneration of green plantlets from oat (*Avena sativa* L.) leaf-base segments: influence of nitrogen balance, sugar and auxin. *Plant Cell Reports* 20:1156-1161
- Patiño, F (1997) Recursos genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los neotropicos. En: *Propuestas para acciones coordinadas*. FAO. Roma
- Peña, L y Séguin A (2000) Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends Biotechnology* 19:500–506
- Parrot, W (1993) Cell cultures the Biotechnology applications for Banana and plantain improvement. En: *Proceeding of the workshop on biotechnology applications for banana and plantain improvement* pp. 183-191. Reunion IMBAP.1992 San Jose, Costa Rica
- Parrott, W (2002) La embriogénesis somática en angiospermas. En: *Resúmenes: IV Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal, Santa Clara, Cuba*.156p.

- Poupin, MJ y Arce-Johnson P (2005) Transgenic Trees for a New Era. *In Vitro Cell* 41:91-101
- Puentes, DA (2005) *Meliaceae* En: Flora de la Republica de Cuba (Eds.) Greuter, W y Rankin R. Alemania pp.4 -44
- Reed, BM y Chang Y (1997) Medium- and long-term storage of *in vitro* cultures of temperate and nut crops. En: Razdan, M K y Cocking E C (eds.) General aspects (Conservation of plant genetic resources *in vitro*, Vol. 1). Enfield, NC: Science Publishers, Inc.67–106.
- Roustan JP, Latché A, Fallot J (1990) Inhibition of ethylene production and stimulations of carrot somatic embriogénesis by salicylic acid. *Biol. Plant* 32:273-275
- Salvi, D, Singh H, Tivarekar S y Eapen S (2001) Plant regeneration from different explants of neem. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 65:159-162
- Sharma, P, Koche V, Quaraishi A y Mishra SK (2005) Somatic Embryogenesis in *Buchanania lanzan* Spreng. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*—*Plant* 41:645–647
- Schmidt, S y Jøker D (1999) *Swietenia maghagoni*(L.)Jacq. Seed Leaflet. Danida Forest Seed Center. Denmark 2 pp.
- Pennington, TD y Styles T (1981) *Meliaceae*. En: *Flora Neotropica* monograph 28. pp.42
- Raemark, E, Jacobsen E y Visser R (1995) Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81:93-107

- Rao, AQ, Hussain SS, Shahzad MS, Bokharis SYB, Raza MH, Rahka A, Majeed ASA, Ali SZ, Husnain T y Riazuddin S(2006) Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium* Spp.) Univ SCIENCE B 7(4):291-298 291
- Rodríguez, R, Daquinta M, Capote I, Pina D, Lescano Y y Gonzales-Olmedo J (2003) Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* King. X *Swietenia Mahagoni* (L.) Jacq. (Caoba híbrida) y *Cederla odorata* (Cedro).Cultivos Tropicales 24: 23-27
- Saher, S, Piqueras A, Hellin E y Olmos E (2003) Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum*120: 152–161
- Samoylov, VM, Tucker, DM y Parrott WA (1998) Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic cultures: The role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant* 34:8–13
- Tacoronte, M, Vielma M, Mora A y Valecillos C (2004) Propagación *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de yemas axilares .Acta Científica Venezolana 55: 7-12
- Thomas, TD (2006). Effect of sugars, gibberellic acid and abscisic acid on somatic embryogenesis in *Tylophora indica* (Burm.f.) Merrill. *Chinese J Biotechnol* 22: 465-471.
- Toonen, M y De Vries SC (1996) Initiation of somatic embryos from single cells. En:Wang, T L y CUMING A (Eds.) *Embryogenesis: the Generation of a Plant*. Oxford, Bios Scientific Publishers pp. 173-189

- Umehara M, Kamada H (2005) Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis. *Plant Biotechnol.* 22: 253-260
- Victor, JM y Clement T (2005) Participation of Plant Hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. En: Mujib, A y Samaj J (eds.) *Somatic Embryogenesis* pp.102-118
- Vilches, J (2001) Embriogénesis somática y regeneración de plantas en guayabo (*Psidium guajava* L.) Tesis presentada en Tesis en opción al título académico de *Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal*, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Villa Clara, Cuba
- von Aderkas, P, Rohr R, Sundberg B, Gutmann M, Dumont-BeBoux N y Lelu MA (2002) Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69: 111-120
- von Arnold, S, Sabala I, Bozhkov P, Kyachok J, F y Filanova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:233-249
- Vilchez, J, Albany N y León de Sierralta S (2004) Micropropagación del guayabo (*Psidium guajava* L.) En: Libro de Reportes cortos: VIII Congreso Venezolano de Fruticultura, Venezuela. 27p.
- Yang YG, Guo YM, Guo Y, Guo ZC y Lin JX (2003) Regeneration and large-scale propagation of *Phragmites communis* through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 75: 287-290

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