

## Inducción de callos y regeneración de plantas en *Tectona grandis* L.

Marcos Daquinta\*, Luis Ramos, Iris Capote, Yarianne Lezcano, Romelio Rodriguez, Maritza Escalona.

\*Autor para correspondencia.

Laboratorio de Cultivo de Celulas y Tejidos, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila. Carretera Moron km 9, CP 69450. Cuba. Tele/fax 53 33 266340. e-mail: mdaquinta@bioplantas.cu

### RESUMEN

El trabajo con especies de interés comercial constituye una de las líneas prioritarias de la biotecnología, como herramienta básica en el apoyo al mejoramiento de árboles élitos. La teca (*Tectona grandis* L.), es un forestal de alto interés comercial y ecológico por su rápido crecimiento y la calidad de su madera. Es una especie que tiene graves problemas para la propagación por la alta variabilidad genética de las plantas producidas por semillas. El objetivo de este trabajo fue establecer una metodología para la regeneración de plantas de esta especie forestal con vistas a utilizarla en los programas de mejoramiento genético. Se utilizaron como explantes ápices y botones florales de árboles adultos y cotiledones de semillas. Las semillas se desinfectaron con HgCl<sub>2</sub> al 0.2% durante 10 minutos, para el establecimiento *in vitro* de los cotiledones. Se evaluaron diferentes concentraciones de Thidiazuron en los explantes antes señalados, con el objetivo de lograr la formación de callos y diferentes niveles de Bencilaminopurina y Kinetina para la emisión de brotes. Se logró la formación de callos en todos los explantes empleados. Se formaron callos nodulares a partir de los segmentos de ápices, cotiledones y botones florales y se regeneraron brotes en los callos provenientes de ápices.

Palabras clave: cultivo de tejidos, organogénesis, teca

### ABSTRACT

The rescue of commercial species is a priority for biotechnology to increase multiplication rate and develop reforestation. Such programmes can be carried out simultaneously with the development of the country to maintain the ecosystem natural equilibrium. Teak (*Tectona grandis* L.) is a forest tree of high commercial and ecological value because of its rapid growth and wood quality. Teak is a specie with problems in the propagation as a result of its high genetic variability. For this reason, alternatives to produce propagules have been developed. With the aim to obtain plants regeneration from this were used shoot tips and flowers immature of mature tree explants and cotyledons from seed. Different thidiazuron concentrations was tested for callus formation and cytokinins for plants regeneration. Nodular calli was obtained from shoot tips, cotyledons and flowers immature. The shoots regeneration was achieved in calli from shoot tips.

Key words: organogenesis, teak, tissue culture

### INTRODUCCIÓN

La biotecnología es una herramienta que contribuye, tanto a la conservación de la biodiversidad genética, como a la innovación de procedimientos tecnológicos. La producción de plantas con el empleo de esta vía es una alternativa para el rescate y la preservación de los recursos filogenéticos de los bosques tropicales y de esta forma se puede mantener la dinámica y el equilibrio del ecosistema forestal y así el medio ambiente.

La Teca (*Tectona grandis* L.), especie forestal tropical introducida, es originaria de la India, Tailandia y Laos. Esta planta rápidamente ha ganado un puesto preferencial en el mercado mundial por lo vistoso de la madera y la resistencia a enfermedades, entre otras razones. Su cultivo en Cuba procede de semillas introducidas desde Trinidad y Tobago. Es un forestal que se proyecta a ocupar un lugar muy

importante en las exportaciones de la Isla (Betancourt, 1987).

La micropropagación de la Teca vía organogénesis directa mediante el desarrollo y enraizamiento de brotes axilares ha sido descrita con éxito por Nadgauda *et al.* (1997), Monteuis *et al.* (1998) y recientemente por Daquinta *et al.* (2001), como una herramienta para la propagación masiva, reemplazando en un elevado porcentaje a los sistemas de propagación tradicional. De esta manera se podrán producir plantas de genotipo deseado con una alta estabilidad genética provenientes de bancos y jardines clonales. Sin embargo, no se cuenta con un método de regeneración indirecta que pueda ser empleado en los programas de mejoramiento genético.

Teniendo en cuenta estos antecedentes el presente trabajo se propuso el siguiente objetivo: Evaluar la capacidad de diferentes explantes de

Teca en la formación de callos y la regeneración de plantas a partir de estos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Evaluación de diferentes niveles de Thidiazuron (TDZ) en la formación de callos en ápices, entrenudos, cotiledones y botones florales

Para evaluar el TDZ en la inducción de callos se utilizaron ápices y entrenudos de brotes provenientes de plantas *in vitro* obtenidas a partir de árboles plus según Daquinta *et al.* (2001), así como cotiledones de semillas y botones florales de árboles, los cuales fueron previamente desinfectados con bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) a 0.2% durante 10 minutos y después enjuagados varias veces con agua destilada estéril.

Tanto los ápices y entrenudos de los brotes así como los cotiledones y botones florales fueron establecidos en los tratamientos siguientes:

--MS (Murashige y Skoog, 1962) al que se adicionó 0.0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg.l<sup>-1</sup> TDZ.

Se utilizó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento. Cada frasco constituyó una repetición, con siete explantes por frasco. Los cultivos se mantuvieron en la cámara de luz artificial con un flujo de fotones fotosintéticamente activos de 26  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . A las seis semanas se evaluó el número de explantes que formaron callos, así como las características de los mismos.

### Inducción de brotes a partir de callos de ápices de Teca

Para inducir la regeneración de brotes se emplearon 200 mg de callos obtenidos a partir de ápices de Teca en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con 2.0 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ y se subcultivaron en los siguientes medios de cultivo:

--MS

--MS +0.5 mg.l<sup>-1</sup> BAP +0.25 mg.l<sup>-1</sup> Kin

--MS +0.25 mg.l<sup>-1</sup> BAP +0.12 mg.l<sup>-1</sup> Kin

Se incubaron en condiciones de luz artificial con un flujo de fotones fotosintéticamente activo de 26  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Se utilizó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento. Cada frasco constituyó una repetición, con siete explantes por frasco. A las seis semanas se evaluó el número de callos que regeneraron plantas.

Para el procesamiento estadístico se empleó el análisis de varianza simple y se realizó la prueba de Duncan, mediante el procesador estadístico SPSS. Los datos en porcentaje se transformaron según la ecuación  $X = 2 \arcsin \sqrt{X/100}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación de diferentes niveles de TDZ en la formación de callos en ápices, entrenudos, cotiledones y botones florales

En la tabla 1 se presenta el comportamiento del TDZ en la formación de callos a partir de diferentes explantes de Teca.

Tabla 1. Porcentaje de explantes (ápices, entrenudos y cotiledones de Teca) que formaron callos con diferentes niveles de TDZ a las seis semanas.

Tratamientos mg.l <sup>-1</sup> TDZ	Ápices	Entrenudos	Cotiledones
0.0	0.0 c	0.0 b	0.0 c
0.1	68 b	100 a	30 a
0.25	68 b	100 a	12 b
0.5	76 b	100 a	13 b
1.0	76 b	100 a	22 a
2.0	92 a	100 a	25 a
Error Estándar	0.08	0.32	0.15

Medias con letras desiguales difieren entre sí para el test de Duncan, ( $p < 0.05$ ).

Como se observa la formación de callos a partir de ápices de plantas *in vitro* aumentó con el incremento de las concentraciones de TDZ en el medio de cultivo. La mayor respuesta en la formación de callos se obtuvo con 2.0 mg.l<sup>-1</sup>. De igual modo, se encontraron diferencias en la respuesta con 0.5 y 1.0 mg.l<sup>-1</sup> del producto. La menor respuesta se

obtuvo con 0.1 y 0.25 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ, sin diferencias entre estos niveles, con un comportamiento por debajo de la dosis intermedia, pero sin diferencias estadísticas.

Murthy *et al.* (1998) señalaron que la aplicación del TDZ inducía diversas respuestas, desde la inducción

de callos hasta la formación de embriones somáticos. Estos autores continuaron señalando que el TDZ puede actuar a través de la modulación de los reguladores del crecimiento endógenos en las plantas, ya sea de forma directa o como resultado del estrés inducido.

Existe relativamente poca información disponible concerniente al tipo de callo inducido por el TDZ. Sin embargo, a bajas concentraciones, el TDZ, generalmente, tiende a fomentar la formación de callos nodulares verdes y compactos (Murthy y Saxena, 1998). En el presente trabajo se obtuvieron callos con estructuras similares a las señaladas por estos autores.

El TDZ está entre las sustancias con actividad como citoquinina más usada para el cultivo de tejidos de plantas maderables. A concentraciones mayores de 0.2 mg.l<sup>-1</sup> puede estimular la formación de callos, brotes adventicios o embriones somáticos (Huetteman y Preece, 1993).

Al analizar la tabla 1, se observa que los entrenudos presentaron 100% de formación de callos en todas las concentraciones de TDZ evaluadas. Hay que señalar que estos callos fueron pequeños, compactos y duros, características propias de callos no morfogénicos. Por otra parte, en los cotiledones se logró la formación de callos en todos los niveles de TDZ. Con el medio de cultivo MS con la adición de 0.1 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ se alcanzó el mayor porcentaje de

formación de callos, sin diferencias estadísticas con el porcentaje de callos formados en las concentraciones mayores (1.0 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ).

Los efectos del TDZ sobre la formación de yemas y brotes a partir de segmentos de hipocotilos de *Liquidambar styraciflua* (especie forestal) fueron evaluados por Kim *et al.* (1997a), logrando, a bajas concentraciones de TDZ (0.1 mg.l<sup>-1</sup>), estimular la producción de brotes. Sin embargo, en este trabajo se logró la inducción de callos en cotiledones con concentraciones iguales a las señaladas por estos autores.

Aunque las respuestas en este tipo de explante están por debajo de las obtenidas en los entrenudos, es de destacar que los callos obtenidos en cotiledones fueron friables, nodulares, con buenas características.

Al continuar el análisis de la tabla 1, se puede observar que los entrenudos presentaron la mayor respuesta a la formación de callo en todas las concentraciones de TDZ. En *Xanthosoma sagittifolium*, Nyochemdeny y Gaston (1998) encontraron que el TDZ aumentó la producción de callo conjuntamente con el Dicamba y que, resultó más favorable en peciolo que en otro tipo de explantes. Por lo que, el explante utilizado es un elemento importante para la obtención de callos en una determinada especie. Es de destacar que los callos obtenidos en este trabajo, a partir de entrenudos fueron compactos y muy duros.

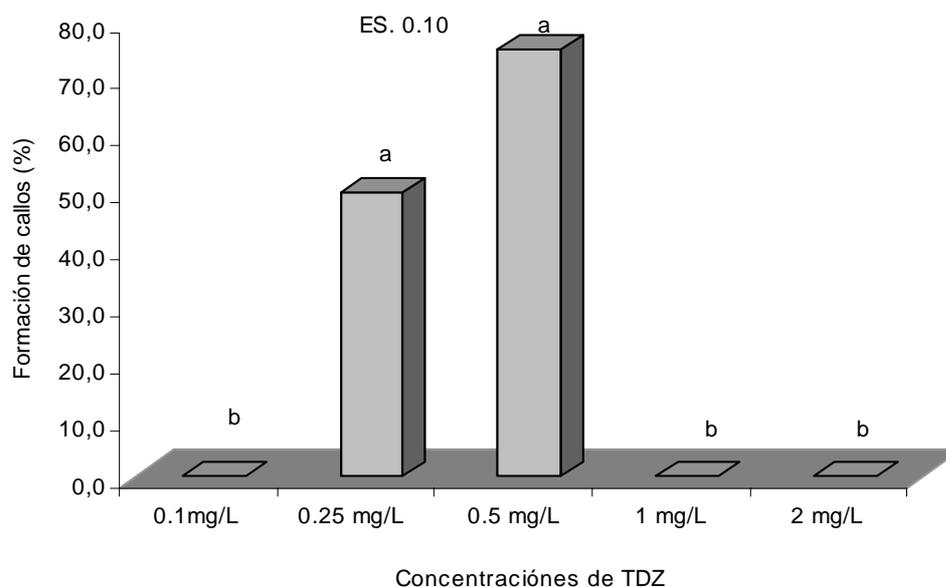


Figura 1. Formación de callos en secciones de botones florales de Teca, en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de TDZ. Medias con letras desiguales difieren entre sí para el test de Duncan, ( $p < 0.05$ ).

A diferencia de los explantes de ápice, la respuesta en los botones florales fue menor. Se encontró respuesta a la formación de callos solo

en los medios de cultivo con 0.25 y 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ, sin diferencias estadísticas entre estos (Figura 1)

En Teca, los mejores resultados en los ensayos con segmentos de botones florales cultivados con TDZ se lograron con  $0.5 \text{ mg.l}^{-1}$ , pero si estos resultados se comparan con otros tipos de explantes, los mismos fueron inferiores y por tanto, los explantes menos utilizados. Sin embargo, no dejan de ser explantes interesantes para los trabajos de cultivo de tejidos, por sus características juveniles y una alta actividad meristemática favorables para los procesos de embriogénesis somática.

El uso de tejidos originarios de brotes florales y tejidos embrionarios constituyen una alternativa para la regeneración *in vitro* de *Anacardium occidentale* y *Theobroma cacao* (Bueno *et al.*, 1997 y López-Baez *et al.*, 1998). Carini *et al.* (1998) señalan la formación de callos embriogénicos en diferentes variedades de *Citrus sinensis* utilizando como explantes estilo, estigma y óvulos maduros. La formación de callos en botones florales de Teca no está señalada en la literatura por lo que estos resultados son de gran interés.

Los tejidos de flores e inflorescencias han sido usados como explantes para la iniciación de cultivos embriogénicos en plantas maderables, vía embriogénesis somática indirecta (Merkle *et al.*, 1999). Estos investigadores continúan

señalando que el uso de tales explantes ofrece una importante ventaja para el mejoramiento de árboles forestales, lo que hace posible la clonación de árboles lo suficientemente maduros para ser evaluados por su crecimiento superior y otras cualidades. Prakash y Chand (1998), con vista a solucionar los problemas de la micropropagación a partir de explantes colectados de árboles adultos de *Boswellia serrata*, especie forestal, seleccionaron ovarios no polinizados para los estudios *in vitro*.

Por otra parte, Merkle y Battle (2000) señalaron que la inducción de embriogénesis en *Liquidambar styraciflua* (una de las especies forestales más importantes de los EE.UU), fue influenciada por el tipo de explante; con flores masculinas se producen hasta cinco veces más embriones que con las inflorescencias femeninas. Las secciones florales de Teca dan lugar a callos grandes, duros y compactos, con apariencias de glóbulos y callos más pequeños, nodulares y con buenas características morfológicas.

#### Inducción de brotes a partir de callos de ápices de Teca

En la figura 2 se observa el comportamiento de la regeneración de brotes a partir de los callos obtenidos de ápices

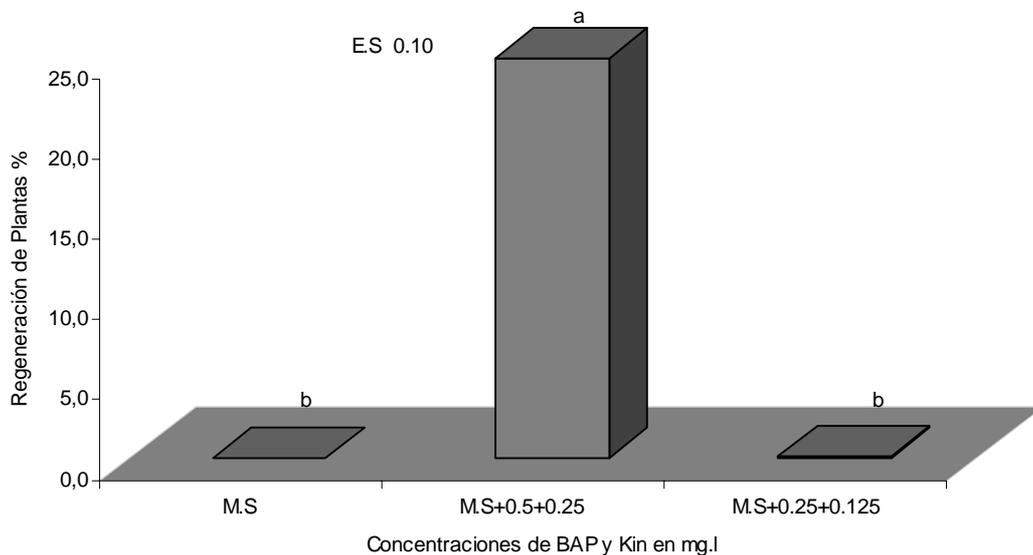


Figura 2. Porcentajes de callos obtenidos a partir de ápices de Teca que muestran la formación de al menos un brote. Medias con letras desiguales difieren entre sí para el test de Duncan, ( $p < 0.05$ ). ES 0.11

Solo se logró la inducción de brotes en el medio de cultivo MS suplementado con  $0.5 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP y  $0.25 \text{ mg.l}^{-1}$  Kin (Figura 2). Cuando se redujo a la mitad la concentración de estas citoquininas la regeneración fue nula, al igual que en el medio de cultivo sin reguladores del crecimiento.

En *Fraximus pensylvanica*, Kim *et al.* (1997b), lograron la formación de brotes con  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP. Esta citoquinina ha sido usada exitosamente para inducir brotes adventicios a partir de explantes de hojas de manzana por Sarwar y Skirvin (1997). Al-Juboory *et al.* (1998) obtuvieron brotes más

grandes a partir de hojas de gardenia (*Gardenia jasminoides*), cuando subcultivaron en medios de cultivo MS con 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de BAP o 2IP. En Teca, Kushalkar y Sharon (1996) lograron la formación de embriones somáticos a partir de callos de yemas apicales en el medio MS suplementado con 0.1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0.01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA. Sin embargo, los callos iniciados a partir de yemas axilares fueron incapaces de formar embriones somáticos sobre medio MS semi-sólido con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento.

En todos los casos se logró solamente la regeneración de brotes y nunca hubo regeneración de raíces en los mismos, por lo que es necesaria la transferencia de éstos para otros medios con vistas a lograr la formación de raíces.

## REFERENCIAS

- Al- Juboory KH, Skirvin RM y Williams DJ (1998). Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) leaf explants. *Scientia Horticulturae* 72: 171-178
- Betancourt BA (1987) Silvicultura especial de arboles maderables tropicales. Editorial Científico Técnico. La Habana. pp. 342-356
- Bueno DM, Mariath JE y Correia D (1997) Tecidos florais e embrionários como fontes de explantes para embriogénesis somática de cajueiro anao precoce. II Encontro Brasileiro de Biotecnología Vegetal, pp 37
- Carini F, Tortorici MC, De Pasquale F y Crescimanno FG (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules and stigma/style explants of sweet orange novel group (*Citrus sinensis* L. Osb). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 183-189.
- Daquinta M, Ramos L, Capote I, Lezcano Y, Rodríguez R y Escalona M (2001) Micropropagación de Teca (*Tectona grandis*). *Revista Forestal Centroamericana* 35: 25-28
- Huetteman CA y Preece JE (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 105-119
- Kim MK, Somner HE, Bongarten BC y Merkle SA (1997a) High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyls segments of Liquidambar L. by Thidiazuron. *Plant Cell Reports* 16: 536-540
- Kim MS, Schumann CM y Klopfenstein N.B (1997b) Effects of Thidiazuron and benzyladenina on axillary shoot proliferation of three green ash (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh) clones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48: 45-52
- Kushalkar R y Sharon M (1996) Direct and indirect somatic embryogenesis in teak (*Tectona grandis* L. ). *Current Science* 71(9): 712-715
- Lopez-Baez O, Fraire-Vasquez G, Hernandez-Velasco B, Holguin-Melendez F, Cueto-Moreno J y Crouzillat D (1998) Les biotechnologies appliquées à l'amélioration génétique et la propagation au cacaoyer au Mexique. *Cahiers Agricultures* 7: 487-491
- Merkle SA, Battle PJ y Bwarnell D (1999) Cloning of mature sweetgum trees via somatic embryogenesis from dormant bud tissues. *In vitro Cell. Dev. Biology* 35, 44 A
- Merkle SA y Battle PJ (2000) Enhancement of embryogenic culture initiation from tissues of mature sweetgum trees. *Plant Cell Reports* 19: 268-273
- Monteuuis O, Bon MC y Goh DKS (1998) Teak propagation by in vitro culture. *Bois et forets des tropiques* 256(2): 1-11
- Murashige T y Skoog TF (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Murthy BNS y Saxena PK (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *Plant Cell Reports* 17: 469-475
- Murthy BNS, Murch SJ y Saxena PK (1998) Thiadiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 34: 267-275
- Nadgauda RS, Kendurkar SV, Kulkarni VM, Jana MM y Mascarerenhas AF (1997) Advances in micropropagation of teak. *IUFRO Symposium-97*, pp 34-37
- Nyochembeng LM y Garton S (1998) Plant regeneration from cocoyam callus derived from shoot tips and petioles. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 127-134
- Prakash DVSR y Chad S (1998) *In vitro* culture of unpollinated ovaries of *Boswellia serrata* Roxb. (Burseraceae). *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4(3-4): 210-212
- Sarwar MR y Skirvin M (1997) Effect of Thiadiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of "Meintosh" apple (*Malus x domestica* Brorkh), *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 68: 95-100.