

Propagación clonal *in vitro* de árboles elite de teca (*Tectona grandis* L.)

In vitro clonal propagation of elite trees of teak (*Tectona grandis* L.)

Dagoberto Castro R. *, Jaiber Díaz G. **, Juan Carlos Linero ***

RESUMEN

El empleo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para la propagación y el mejoramiento de especies de interés forestal es una importante herramienta de apoyo a los programas de reforestación y establecimiento de huertos semilleros clonales. El objetivo del presente trabajo consistió en el desarrollo de una metodología para la propagación clonal *in vitro* de la teca a partir de árboles elite. Como fuente de explantes se emplearon ápices procedentes de brotes epicórmicos, los cuales se sembraron en el medio de cultivo de Schenk y Hildebrandt, enriquecido con los microelementos de Bourgin y Nitsch, Bencil Amino Purina (BAP 0,5 mg/L) y solidificado con agar. Para la fase de proliferación se empleó el medio de cultivo de Murashige y Skoog con las sales nitrogenadas reducidas a la mitad de su concentración normal. Se evaluaron diferentes concentraciones de BAP (0, 0,1, 0,5 y 1,0 mg/L). El mayor coeficiente de multiplicación y mejor calidad de los brotes se logró con 0,5 mg/L de BAP. El enraizamiento se realizó en condiciones *ex vitro*; se emplearon microesquejes apicales con una longitud promedio de 1,5 a 2,0 cm. Éstos se trataron con diferentes concentraciones de AIB (0,250, 500, 1.000, 2.000, 4.000 y 5.000 mg/L). Los mayores porcentajes de enraizamiento y supervivencia de las plántulas se lograron con 4.000 mg/L de AIB. Esta metodología permitió el establecimiento de los árboles en condiciones de campo para apoyar los programas de huertos semilleros clonales y plantaciones a escala comercial de Refocosta.

Palabras clave: Teca (*Tectona grandis*), revigorización fisiológica, micropropagación.

ABSTRACT

The employment of the techniques of plant tissue culture for the propagation and the genetic improvement of forest trees are important support tool to the reforestation programs and the establishment of clonal seed orchards. This work's main objective was the development of a methodology for the *in vitro* clonal propagation of teak, starting from elite trees. As explants source apical shoots from epicormic buds were used, which were placed in the basal medium of Schenk and Hildebrandt supplemented with 0.5 mg/L of BAP, Bourgin and Nitsch micronutrients and solidified with agar. For the proliferation phase it was used the basal medium of Murashige and Skoog with half of the normal NH_4NO_3 and KNO_3 concentration. Different concentrations of BAP were evaluated (0, 0,1, 0,5 and 1,0 mg/L). The biggest multiplication coefficient and better quality of the buds was achieved with 0.5 mg/L of BAP. The rooting was carried out under *ex vitro* conditions; were used microcuttings between 1.5 and 2.0 cm of length. Then, they were treated with different concentrations of IBA (0, 250, 500, 1.000, 2.000, 4.000 and 5.000 mg/L). The biggest rooting percentage and plantlets survival was achieved with 4000 mg/L of IBA. This methodology allowed the establishment of the trees under field conditions to support the programs of clonal seed orchards and operative plantations of Refocosta.

Key words: Teak (*Tectona grandis*), reinvigoration, micropropagation.

* I.A.Ph.D. Universidad Católica de Oriente. Unidad de Biotecnología. AA.008. Rionegro (Antioquia). Colombia. e-mail: dcastro@uco.edu.co

** A.A. Universidad Católica de Oriente. Unidad de Biotecnología. AA.008. Rionegro (Antioquia). Colombia. e-mail: ubv@uco.edu.co

*** Biólogo. Reforestadora de la Costa S.A. Proyecto La Gloria. e-mail: refores1@latino.net.co

INTRODUCCIÓN

La teca es una de las especies forestales de mayor valor y demanda en la industria maderera y se convierte en un atractivo negocio para inversionistas, donde la biotecnología puede garantizar el suministro de plantas mejoradas. En el mundo desde 1980 se iniciaron los primeros trabajos para la adaptación de metodologías de propagación, los cuales se enfocaron inicialmente hacia el control de factores limitantes como la contaminación y la oxidación originada por la liberación de polifenoles al medio de cultivo, causando la muerte de los explantes. En trabajos posteriores (Mascarenhas *et al.*, 1982) informan sobre el establecimiento y desarrollo de yemas vegetativas de árboles de cien años de edad y lograron un 10% de enraizamiento. En la última década se han destacado algunos centros en la investigación sobre las técnicas del cultivo de tejidos en teca con el propósito de utilizarlas en el ámbito comercial operativo; uno de ellos es el Royal Forest Department de Tailandia en conjunto con la Universidad de Chiang Mai, quienes tienen como objetivos específicos el cultivo *in vitro* de embriones para apoyar los programas de progenies de familias seleccionadas para los programas avanzados de mejoramiento; el cultivo de yemas y ápices de árboles maduros para la propagación masiva de clones selectos para el establecimiento de programas de plantación; cultivo de callos y anteras para la creación de nuevos clones o variedades para el programa de mejoramiento. En la actualidad existen grandes laboratorios en Tailandia y China especializados en la producción comercial de esta especie.

El objetivo de la presente investigación fue el de adaptar la metodología para la propagación clonal *in vitro* de árboles adultos de teca seleccionados por sus características fenotípicas superiores en la plantación de Refocosta, entidad ubicada en el departamento de Magdalena (Colombia), como apoyo a sus programas de mejoramiento genético de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

El propósito del trabajo con explantes adultos es el de micropropagar árboles "plus"; es decir, árboles con características fenotípicas sobresalientes, con relación a la media de la población, para apoyar programas de establecimiento de huertos clonales semilleros, así como para multiplicar masivamente materiales deseables.

Se emplearon árboles de teca de 18 años de edad, seleccionados por sus características superiores de altura, circunferencia del fuste (D.A.P.), calidad de la madera y rectitud del fuste; luego se derribaron para la inducción de brotes epicórmicos.

A partir de estos brotes se tomaron yemas que se desinfectaron con etanol (50%) durante un minuto y nitrato de plata (0,5%) durante cinco minutos. En la fase de establecimiento se evaluaron los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) y el medio compuesto por los macroelementos de SH (Schenk y Hildebrandt, 1972), microelementos de Bourgin y Nitsch, enriquecidos con Bencil Amino Purina (BAP 0,5 mg/L). Los cultivos se mantuvieron en condiciones de total oscuridad durante dos semanas y luego se colocaron en un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, manteniendo una temperatura entre 24 y 28°C.

Para la multiplicación se utilizó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS), con las sales de nitrato de amonio y nitrato de potasio diluidas a la mitad, suplido con L-Glutamina (0,5 g/L), sacarosa (30 g/L) y agar (6,5 g/L). Se evaluó el efecto de tres concentraciones del 6-Bencil Amino Purina – BAP (0, 0,1, 0,5 y 1,0 mg/L). Los explantes se mantuvieron con un fotoperíodo de 12 horas luz, con unas condiciones de FFF de 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una temperatura entre 24°C y 28°C. Para la etapa de enraizamiento *in vitro* se empleó el medio de cultivo de Lloyd y McCown – WPM y se evaluó el efecto de diferentes concentraciones del ácido indolbutírico –AIB (0, 0,1, 0,5 y 1,0 mg/L). Para el enraizamiento *ex vitro* se tomaron microesquejes apicales con una longitud promedio entre 1,5 y 2,0 cm y se trataron mediante el sistema de inmersión rápida durante 30 segundos con diferentes concentraciones de AIB (0, 250, 500, 1.000, 2.000, 4.000 y 5.000 mg/L) y luego sembrados en *pellets* de turba. Éstos se ubicaron en semilleros con tapa plástica transparente y se colocaron en condiciones controladas de temperatura de 24°C a 28°C, alta luminosidad, 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas luz. Luego se pasaron a invernadero y se trasplantaron a bolsas de un kilogramo de capacidad. Después de un período de tres meses, los árboles se sembraron en campo a una distancia de tres por tres entre plantas y calles, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La dificultad para propagar vegetativamente especies leñosas está directamente relacionada con la edad de los materiales seleccionados. La maduración o transi-

ción de la fase juvenil a la fase adulta puede ser definida como la etapa de desarrollo que induce cambios en las características morfológicas y fisiológicas, dirigidas a la adquisición de competencia reproductiva del árbol (Pierik, 1990). Para el desarrollo de la metodología del presente trabajo se propuso como técnica de revigorización la inducción de brotes epicórmicos o yemas latentes a partir de árboles cortados a ras de piso. El proceso de inducción y desarrollo de estos brotes tuvo una duración de cuatro a seis semanas, a partir de la cual se pueden cosechar las estacas. Sin embargo, en las experiencias preliminares las yemas que se emplearon a partir de estos materiales presentaron problemas de alta contaminación y oxidación *in vitro*. Por tanto, las estacas se mantuvieron en invernadero en cámaras húmedas para la inducción de rebrotes, los cuales mostraron características de juvenilidad, morfológicamente visibles por el tamaño más pequeño y forma alargada de las hojas. Para los posteriores ensayos, como fuente de explantes se emplearon yemas procedentes de los brotes rejuvenecidos.

Etapa de establecimiento

Como medios de cultivo para el establecimiento se evaluaron los medios de cultivo de Murashige y Skoog (MS) y Schenk y Hildebrandt modificado (SH). Se encontró una mejor respuesta en el medio SH, el cual, al ser un medio con bajos niveles de nitrógeno, permite un mejor comportamiento de los explantes (véase tabla 1).

Etapa de proliferación

Después de 30 días se observa que los brotes se han diferenciado completamente y aparecen los primordios foliares, momento en el cual se inicia la etapa de multiplicación. Para esta etapa se utilizó el medio de MS, con el nitrato de amonio y el nitrato de potasio diluidos a la mitad de su concentración normal y enriquecido con diferentes concentraciones de BAP. En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos y se observa una respuesta positiva cuando el BAP se utilizó en concentraciones entre 0,5 y 1,0 mg/L. Los indicadores correspondientes a longitud de los brotes y número de hojas no se vieron afectados por los tratamientos; sin embargo, se observa cómo al utilizar la mayor concentración de BAP se produjo el efecto de hiperhidricidad.

Tabla 1. Evaluación de dos medios de cultivo en la etapa de establecimiento de yemas de Teca (*T. grandis*).

Medio de cultivo	Prendimiento (%)	Longitud de los brotes (cm)	No. Hojas
MS	40	2,0	3,5
SH	90	2,5	4,0

Tabla 2. Efecto de diferentes concentraciones del BAP sobre la multiplicación *in vitro* de Teca (*T. grandis*).

BAP mg/L	No. Brotes	Longitud (cm)	No. Hojas	Hiperhidricidad (%)
0,0	1,2 b	1,4	3,2	0,0 c
0,1	1,5 b	1,4	3,4	0,0 c
0,5	2,5 a	1,5	3,4	5,0 b
1,0	2,7 a	1,4	3,5	16,0 a

Los tratamientos con diferentes letras presentaron significación para $p < 0,05$ por el test de Duncan.

La hiperhidricidad se manifiesta por anomalías anatómicas y morfológicas –como son succulencia de los tejidos de las hojas y tallos, apariencia vítrea de las hojas–, que demeritan la calidad de los brotes. En el caso de la teca, la utilización de bajas concentraciones de la citoquinina, en este caso el BAP (0,5 mg/L), permite mejorar esta condición sin que se afecte la multiplicación de los brotes; adicionalmente, la disminución del nitrato de amonio contribuye a mejorar algunos aspectos bioquímicos relacionados con la biosíntesis de lignina (Ziv y Ariel, 1994).

Etapa de elongación y enraizamiento *in vitro*

Para la producción *in vitro* de plantas, gran parte del éxito depende del proceso de aclimatación; al respecto, la formación de raíces adventicias en los explantes es el factor limitante. El enraizamiento puede ocurrir en condiciones *in vitro* o *ex vitro*, dependiendo de la disponibilidad de la respuesta morfogenética de los brotes.

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos, donde se observa que esta especie tiende a enraizar espontáneamente. De todas maneras, existe dependencia de la adición exógena del regulador de crecimiento. Las variables correspondientes a longitud y número de raíces y hojas no se vieron afectadas. Las concentraciones de AIB entre 0,5 y 1,0 mg/L mostraron el mayor porcentaje de enraizamiento, mientras que mayores concentraciones tendieron a

Tabla 3. Efecto de diferentes concentraciones del IBA sobre el enraizamiento *in vitro* de teca (*T. grandis*).

AIB (mg/L)	Enraizamiento (%)	No. Raíces	Longitud raíces (cm)	No. Hojas
0	11,5 c	3,0	1,5	4,0
0,1	16,5 c	3,0	1,5	4,0
0,5	50,0 a	4,0	1,5	3,0
1,0	55,0 a	4,0	1,6	4,0
2,0	35,0 b	3,0	1,3	3,0

Los tratamientos con diferentes letras presentaron significación para $p < 0,05$ por el test de Duncan.

disminuirla; adicionalmente, se presentó la formación de callos en la base de los tallos. De todas maneras, los porcentajes de enraizamiento *in vitro* son muy bajos, particularmente si se requiere propagar masivamente esta especie forestal.

De otra parte, las raíces adventicias formadas *in vitro* desarrollan unas características anatómicas y morfológicas particulares inducidas por las condiciones del medio de cultivo, particularmente la presencia de agar, lo cual las hace en la mayoría de los casos poco eficientes; de igual manera, las conexiones vasculares entre el tallo y las raíces formadas *in vitro* son muy débiles, razón por la cual estas raíces mueren durante la fase de aclimatización. Por tanto, como estrategia de trabajo se optó por efectuar ensayos de enraizamiento *ex vitro*.

Enraizamiento *ex vitro*

En la figura 1 se presentan los resultados obtenidos cuando se utilizaron diferentes concentraciones de AIB en los microesquejes de teca. Se encontró que la concentración de 4.000 mg/L produjo hasta un 90% de

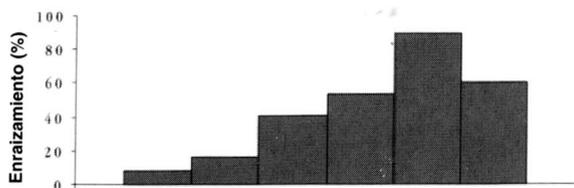


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones del AIB sobre el enraizamiento *ex vitro* de teca (*T. grandis*). Los tratamientos con diferentes letras presentaron significación para $p < 0,05$ por el test de Duncan.

enraizamiento, con un sistema radical más profuso y con formación de raíces secundarias. Concentraciones mayores o menores de esta auxina presentaron una disminución en los porcentajes de enraizamiento, lográndose por tanto un óptimo para las condiciones evaluadas. El proceso de enraizamiento ocurre a partir de los 15 días y se extiende hasta los 30 días. Algunos autores han demostrado que la técnica del enraizamiento *ex vitro* es la más apropiada para las especies leñosas, donde la formación de

un sistema radical secundario es fundamental para un apropiado funcionamiento de estos órganos (Rogers y Smith, 1992; Smith *et al.*, 1992). Por otra parte, se ha estimado que las labores de enraizamiento *in vitro* pueden alcanzar entre un 35% y 75% de los costos totales de las plantas propagadas a través de cultivo de tejidos, dependiendo de la especie. El enraizamiento *ex vitro* de los microesquejes disminuye en cierta forma estos costos.

Aclimatización de las plántulas

La supervivencia de las plántulas varía entre el 85% y 90%, después de cuatro a seis semanas cuando las plántulas tienen un tamaño adecuado, es decir, a más de 7,0 cm de altura se trasplantan a bolsas, donde permanecen unos dos meses, para luego ser sembradas en campo.

Plantaciones en campo

A los 18 meses se realizó la medición de los árboles. Los resultados mostraron que los árboles tuvieron alturas promedio de 9,13 m y diámetro del fuste de 7,41 cm. Respecto a las características fenotípicas de los árboles micropropagados y establecidos en campo, éstos presentan fustes rectos, sin ramificaciones o crecimientos plagiotrópicos.

Un aspecto importante en la generación de las técnicas para la propagación clonal *in vitro* de la teca es su impacto en el apoyo a los programas de mejoramiento genético y de establecimiento de plantaciones. En efecto, la empresa Refocosta S.A., desde 1996, en convenio con la Universidad Católica de Oriente, inició un programa de investigación para establecer un protocolo de micropropagación de árboles adultos, seleccionados por sus características superiores. Una vez logrado este propósito, se inició

una segunda fase que consistió en realizar una selección de árboles "plus", es decir, árboles con características fenotípicas superiores. Se preseleccionaron cien árboles candidatos, de los cuales finalmente se seleccionaron 30 árboles "plus". Estos árboles se micropropagaron y se están empleando para el establecimiento de huertos clonales semilleros y plantaciones multiclonaes. En la actualidad se tienen sembradas 20 hectáreas con estos materiales, lo cual es un trabajo pionero en Latinoamérica.

Respecto al uso operativo de la micropropagación en programas comerciales, se debe hacer un balance de la relación ganancias contra riesgos. En primer lugar, las ganancias o ventajas de las plantaciones clonales son las operaciones silviculturales, la uniformidad de la madera entre los árboles, acortamiento de los ciclos de rotación, entre otras. De otra parte, el riesgo al establecer plantaciones clonales es el ataque y la propagación de plagas, lo cual puede disminuirse con el establecimiento de un determinado número de clones que mantengan algún grado de diversidad en las plantaciones.

CONCLUSIONES

Se desarrolló una tecnología que permite la propagación clonal masiva de árboles "plus" de teca, a partir de un proceso de revigorización mediante la inducción de brotes epicórmicos. Esta técnica garantiza un establecimiento del 90% de las yemas sin problemas de oxidación y contaminación endógena. Se han logrado coeficientes de multiplicación del 2,5, que para esta especie forestal se puede considerar adecuada. Se presenta como alternativa el enraizamiento de los brotes, en condiciones *ex vitro*, con un 90% de plantas que forman raíces competentes. Durante la fase de aclimatización se han logrado porcentajes de prendimiento entre el 85% y 90%. De acuerdo con White y Gavinlertvatana (1999), el desarrollo de las técnicas de micropropagación en árboles de teca se presentan como una alternativa para incrementar el empleo de la selección clonal y el establecimiento de plantaciones a escala operacional, pues hasta el momento los programas convencionales de reproducción vegetativa mediante el injerto de yemas presenta algunas dificultades y no ha sido muy eficiente para los programas de producción de semillas (Kaosa-ard *et al.*, 1998). De todas maneras, con el propósito de mantener una adecuada diversidad genética se deben emplear estrategias de reproducción sexual y vegetativa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la empresa Reforestadora de la Costa, Refocosta, por su apoyo logístico y financiero al desarrollo del presente proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Kaosa-ard, A., Suangtho, V. and Kjaer, E. 1998. Genetic improvement of teak (*Tectona grandis*) in Thailand. *Forest Genetics Resources* N° 26. Rome, FAO.
- Mascareñas, A. F., Hazara, S., Potdar, U., Kulkarni, D. K. y Gupta, P. K. 1982. Rapid clonal multiplication of mature forests tree through tissue culture. Fujiwara (Ed). Japan, pp. 719-720.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays whit tobacco tissue cultures. *Physiol, Plant.* 15: 473-497.
- Pierik, R. L. M. 1990. Rejuvenation and micropropagation. In: H. J. J. Nijkamp, L. H. W. Vanderplas and J. Van Artijk (Eds). *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht Netherlands, pp. 91-101.
- Rogers, R. B. y Smith M. A. L. 1992. Consequences of *in vitro* and *ex vitro* root initiation for miniature rose production. *J. Hort. Sci.*, 67: 535-540.
- Schenk, R. U. and Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.
- Smith, M. A. I., Eichorst, S. M., y Rogers, R. B. 1992. Rhizogenesis pretreatments and effects on microcuttings during transition. *Acta Hort.* 319: 77-82.
- White, K. J. and Gavinlertvana, P. 1999. Vegetative reproduction of teak – the future to increased productivity. Paper presented at the regional seminar Site, Technology and Productivity of teak plantations, 26-29 January 1999, Chiang Mai. Thailand.
- Ziv, M., T. Ariel. 1994. Vitrification in relation to stomatal deformation and malfunction in carnation leaves *in vitro*. In: Lumsden, P. J., J. R. Nicholas, W. J. Davies (eds.) *Physiology growth and development of plants in culture*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp. 143-154.