

Brotación in vitro de yemas de teca (*Tectona grandis* L. f.)

Sprouting buds in vitro teak (*Tectona grandis* L. f.)

Fabiana Rojas Parajeles¹
Ana Abdelnour Esquivel²

Fecha de recepción: 20 de enero del 2012
Fecha de aprobación: 19 de marzo del 2012

Rojas, F; Abdelnour, A. Brotación in vitro de yemas
de teca (*Tectona grandis* L. f.).
Tecnología en Marcha. Vol. 25, N° 5. Pág 67-72.

Este artículo cuenta con el aval de la
Vicerrectoría de Investigación y Extensión del
Tecnológico de Costa Rica

- 1 Ingeniera en Biotecnología. Investigadora. Escuela de Ingeniería Forestal. Tecnológico de Costa Rica. Teléfono 2550-2313. Correo electrónico: farojas@itcr.ac.cr
- 2 Catedrática, investigadora. Centro de Investigación en Biotecnología, Tecnológico de Costa Rica. Teléfono 2550-9029. Correo electrónico: aabdelnour@itcr.ac.cr

Resumen

La teca (*Tectona grandis* L.f.) es una especie maderable exótica introducida a Costa Rica para la siembra de plantaciones comercial por la alta demanda de su madera, su rápido crecimiento y su alta calidad. Inicialmente se utilizó la semilla como único material de siembra y la pobre calidad de muchas de las plantaciones impulsó el inicio de programas de mejora genética. La propagación clonal tomó mucha importancia en estos programas y el cultivo *in vitro* se convirtió en una herramienta valiosa para la propagación masiva de los árboles élites.

Por lo anterior, este trabajo se enfocó en evaluar el efecto de varias concentraciones de dos reguladores de crecimiento, bencilaminopurina (BA) y ácido indolacético (AIB), solos y en combinación, en la brotación de yemas dormantes y formación de callos de teca. Tanto el análisis estadístico como la observación visual mostraron que el tratamiento que consistió de 0,005 mg/l de AIA fue el mejor para incrementar la brotación de las yemas y para disminuir la formación de callo.

Palabras clave

Teca, *Tectona grandis*, brotes, nudos, regeneración, cultivo *in vitro*.

Abstract

Teak (*Tectona grandis* L.f.) is an exotic timber species introduced to Costa Rica for commercial plantations due to the high demand for its wood, rapid growth and high-quality. Initially the seed was use as the only planting material, but the poor quality of many of the plantations resulted in the initiation of genetic improvement programs. The introduction of clonal propagation in these programs and the establishment of *in vitro* culture techniques became import tools for mass propagation of the selected elite trees.

On the foregoing, this work focused on assessing the effect of several concentrations of two growth regulators, benzylaminopurine (BA) and indole acetic acid (AIB), alone and in combination, in the budding of dormant buds and callus formation of teak. Both the statistical analysis and the visual observation showed that the treatment consisted of 0.005 mg/l of IAA was the best to increase the budding of the dormant buds and to decrease the callus formation.

Key words

Teak, *Tectona grandis*, shoots, nudes, regeneration, *in vitro* culture.

Introducción

La teca (*Tectona grandis* L. f.), (Verbenaceae), es una especie maderable nativa de la India, Burma, Tailandia y Laos (Keogh 1987; Daquinta *et al.* 2001). Crece mejor en clima tropical cálido, con estación seca de 3-5 meses, precipitaciones anuales de 1500-2000 mm y temperaturas entre 22 y 27°C (Keogh 1987). Debido al avance de la deforestación y a que el mercado de la madera se ha nutrido de bosques naturales para la obtención de madera, en los últimos años la teca se ha introducido en varios países, entre ellos Costa Rica, para el establecimiento de plantaciones comerciales (Montagnini, 2004).

Abdelnour y Muñoz (2005) señalan el interés de muchos países por incluirla en los programas de reforestación debido principalmente a la alta demanda de su madera, su rápido crecimiento y su madera que es de alta calidad, además de que presenta resistencia a algunas enfermedades (Daquinta *et al.*, 2001). La propagación de teca se realizó por semilla de varios orígenes y como resultado muchas de estas plantaciones resultaron de baja calidad. Esta situación justificó el inicio de programas de mejoramiento.

Murillo y colaboradores (2001) mencionan que tal situación ha venido cambiando a través de la propagación clonal, tomando esta vía de multiplicación mucha importancia en los programas de mejoramiento, ya que permite capturar el 100 % de la información genética contenida en un árbol superior seleccionado, lo que resulta en mayores retornos por ganancias en calidad y uniformidad de las plantaciones (Monteuuis *et al.*, 1998). Dentro de las técnicas de propagación clonal, el cultivo de tejidos *in vitro* o micropropagación ha tenido un uso limitado en especies forestales, sin embargo, se han hecho esfuerzos importantes por aplicar esas técnicas no solo a especies de interés comercial con propósitos de producción, sino también con fines de conservación (Umboh, 1988; Daquinta *et al.* 2001, Abdelnour *et al.*, 2007).

En teca, varios trabajos muestran la factibilidad de propagar teca bajo condiciones *in vitro*, tanto a partir de semillas y brotes, como a partir de la regeneración de callos (Abdelnour y Muñoz, 2005; Daquinta y colaboradores, 2002; Monteuuis y colaboradores, 1998). Sin embargo, uno de los problemas observados durante la micropropagación

de teca está relacionado con el brote apical, ya que posee altos contenidos de tectonina, que al oxidarse provoca la muerte del explante, imposibilitando su regeneración y multiplicación. Esto podría representar un problema cuando se necesita cultivar un meristema o yema apical para producir plantas libres de patógenos y durante la recuperación de los materiales después de un proceso de crioconservación (Abdelnour *et al.*, 2007).

Por lo anterior, esta investigación fue dirigida a evaluar la brotación y el desarrollo de yemas latentes de teca (*T. grandis*), explante que permitiría tanto la regeneración después de la crioconservación como el aislamiento de meristemas, en condiciones *in vitro*, en presencia de varias concentraciones de BA y AIA.

Materiales y métodos

El ensayo fue realizado en el laboratorio de cultivo de tejidos del Centro de Investigaciones en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, ubicado en Cartago, Costa Rica. El material inicial para la experimentación consistió de plántulas provenientes de semillas donadas por CACH (Centro Agrícola Cantonal de Hojancha, Guanacaste, Costa Rica), germinadas *in vitro*. El medio de cultivo utilizado para la geminación de las semillas fue un MS (Murashige y Skoog, 1962) enriquecido con 0.1 mg/l de tiamina, 0.5 mg/l de ácido nicotínico, 0.5 mg/l de piridoxina, 2 mg/l de glicina, 100 mg/l de inositol, 1 mg/l de BAP, 3% p/v de sacarosa y 2,2 g/l de phytigel®. El pH del medio se ajustó a 5,7 antes de ser esterilizado en autoclave durante 20 min a 1,2 ATM/cm² de presión para alcanzar una temperatura de 121°C.

Para los ensayos de evaluación de la brotación y el desarrollo de yemas latentes, las plantas germinadas se seccionaron en los entrenudos, muy cerca de la axila, de manera que se sembró en el medio de cultivo la sección entre el tallo y la unión con el peciolo, es decir, el nudo, donde se encuentran las yemas latentes. Estos explantes se cultivaron en el medio descrito arriba, enriquecido con varias concentraciones y combinaciones de benciladenina (BA) (0, 0,5, 1 y 2 mgL⁻¹) y ácido indolacético (AIA) (0, 0,005, 0,01, 0,02) (cuadro 1).

Cada unidad experimental consistió de un explante por tubo de ensayo (150x25 mm), conteniendo 10 ml de medio de cultivo y para cada tratamiento se

Cuadro 1. Concentraciones de benciladenina (BA) y ácido indolbutírico (AIB) y sus respectivas combinaciones, adicionadas al medio de cultivo, para evaluar la brotación y desarrollo de las yemas latentes de teca (*Tectona grandis* L. f.).

Concentración (mgL ⁻¹)				
BA	AIA			
	0	0,005	0,01	0,02
0	0 + 0	0 + 0,005	0 + 0,01	0 + 0,02
0,5	0,5 + 0	0,5 + 0,005	0,5 + 0,01	0,5 + 0,02
1	1 + 0	1 + 0,005	1 + 0,01	1 + 0,02
2	2 + 0	2 + 0,005	2 + 0,01	2 + 0,02

efectuaron 25 repeticiones. El material se mantuvo durante todo el proceso de evaluación en un cuarto de crecimiento a una temperatura promedio de 28,5 °C, máxima de 31 °C y mínima de 26 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y la luminosidad de 2040 lux.

El porcentaje de brotación y formación de callo en los explantes se evaluó semanalmente hasta los 33 días, para cada tratamiento.

Para el análisis estadístico se realizó un ANDEVA utilizando Microsoft Excel, para los datos de brotación y formación de callo obtenidos a partir de las yemas en latencia presentes en los nudos.

Resultados y discusión

Después de permanecer 33 días en cultivo, se observó que solo el 24% de las yemas brotó en ausencia de reguladores de crecimiento, pero los brotes no mostraron formación de callo. Aquellas yemas cultivadas en el medio enriquecido con 0,5, 1 y 2 mg/l de BA mostraron baja o ninguna formación de brotes (0, 4 y 0% respectivamente) y la formación de callo se presentó entre el 88% y el 100% de los explantes en estos tratamientos (figura 1). Resultados similares fueron observados cuando se combinaron las diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento. Por otra parte, los mayores porcentajes de brotación de yemas y los menores porcentajes de formación de callo se observaron cuando los medios fueron enriquecidos con AIA como único regulador del crecimiento, siendo el mejor tratamiento el que consistió de 0,005 mg/l de AIA en el medio de cultivo, ya que indujo 56% de brotación de yemas y 0% de formación de callo (cuadro 2).

Los resultados parecen mostrar que el BA fue el responsable primario de la formación de callo, puesto que cuando el AIA fue combinado con cualquiera de las concentraciones de BA se produjeron altos porcentajes de formación de callo, así como también es de particular interés observar que luego del tratamiento 5 (0,005 mg/l de AIA), los tratamientos con menor porcentaje de formación de callo son aquellos que tienen solo AIA. Estos resultados mostraron que fue posible obtener la regeneración de brotes en un medio de cultivo que contenía únicamente AIA y en muy bajas concentraciones, lo que es muy favorable cuando se quieren regenerar planta sin pasar por etapa de callo (figura 2).

De acuerdo con George y colaboradores (2008), las auxinas en cultivo de tejidos participan en la diferenciación de brotes y raíces y estimulan la división celular. Las citocininas también son necesarias para la estimulación de la división celular y son efectivas estimulando la iniciación de brotes y por lo general se utilizan en combinación con las auxinas para este propósito.

De acuerdo con el balance entre estas en el medio de cultivo, se estimula la producción de brotes, callos o raíces, sin embargo, la proporción de estas en el medio para cada uno de estos procesos de morfogénesis difiere entre las diferentes especies, así, algunas requieren únicamente citocininas en el medio, combinaciones de citocininas y auxinas, ausencia de citocininas o presencia de bajas concentraciones de auxinas.

El uso de citocininas para inducir la brotación de yemas ha sido informado en muchas especies leñosas. En melina (*Gmelina arborea*) la adición de 0,5 mg/l de BA indujo el mayor número de brotes

Cuadro 2. Brotación y formación de callo a partir de yemas latentes de teca (*Tectona grandis* L.f.) en respuesta al cultivo in vitro en presencia de benciladenina (BA) y ácido indolacético (AIA) solos o en combinación.

Tratamiento	Brotación de yemas (%)	Formación de callo (%)
1 Control (sin reguladores)	24	0
2 0,5 BA	0	100
3 1 BA	4	88
4 2 BA	0	88
5 0,005 AIA	56	0
6 0,5 BA + 0,005 AIA	4	100
7 1 BA + 0,005 AIA	4	92
8 2 BA + 0,005 AIA	8	92
9 0,01 AIA	40	24
10 0,5 BA + 0,01 AIA	0	48
11 1 BA + 0,01 AIA	4	64
12 2 BA + 0,01 AIA	0	80
13 0,02 AIA	20	16
14 0,5 BA + 0,02 AIA	4	40
15 1 BA + 0,02 AIA	0	80
16 2 BA + 0,02 AIA	0	88

a partir de nudos en multiplicación (Gamboa y Abdelnour, 1999, Kanan, 1996), similares resultados fueron observados en cocobolo (*Dalbergia retusa*), *Terminalia arjuna* y otras (Valverde y Alvarado, 2004; Gomes, 2010).

Por otra parte, la combinación de citocininas y auxinas es también una estrategia muy utilizada para la propagación de este tipo de especies, encontrándose que para la inducción de brotes de *Salix tetrasperma* la presencia de BA, pero en la combinación con ANA (ácido naftalenacético) indujo el mayor número de brotes sanos (Kan et al., 2011).

También se encontraron experiencias en las que el uso de reguladores del crecimiento para la brotación de yemas no fue necesario, como es el caso de pilón (*Hieronyma alchornoides*) (Abdelnour et al., 2011). Fueron muy pocos los casos encontrados en que el uso de la auxina, como único de regulador del crecimiento, fue utilizado para la inducción de la brotación de yemas.

Al igual que en esta experiencia, las bajas concentraciones de ANA indujeron la formación de brotes en *Maclura tinctoria*, especie arborea en peligro de extinción; sin embargo, los autores informaron que cuando la concentración de esta auxina se incrementó, se observó un alto porcentaje



Figura 1. Presencia de callo a partir de yemas provenientes de nudos observado en el tratamiento con 0,5 mg/l de BA.

de callogénesis y que no se observó la formación de brotes cuando el medio se enriqueció solamente con BA (Gomes et al., 2010).

Estas experiencias nos hacen concluir que la experimentación en la inducción de brotación y en cada una de las etapas de la micropropagación debe desarrollarse para cada una de las especies de interés, ya que el comportamiento de las diferentes maderables y aún de los diferentes explantes de una misma especie pueden responder de manera particular. En este trabajo, el uso de AIA como único regulador del crecimiento fue el más efectivo para estimular la brotación de las yemas dormantes en los nudos de teca y evitar la formación de callo que podría conducir a variantes no deseadas.



Figura 2. Brotes de teca (*Tectona grandis* L.f.) producidos con 0,005 mg/l de AIA. Obsérvese la ausencia de callo en la base del brote.

Bibliografía

- Abdelnour, A.; Aguilar, M. & Valverde, L. (2011). Micropropagación de pilón (*Hieronyma alchornoides*). *Agronomía Costarricense*. 32(2).
- Abdelnour-Esquivel, A.; Rojas, G. & Alfaro, U. (2007). Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en Marcha*. 20(1): 98-103.
- Abdelnour, A & Muñoz, A. (2005). Micropropagación de *T. grandis* (*Tectona grandis* L.f.). *Kurú: Revista Forestal (Costa Rica)* 2(5). Disponible en: <http://www.itcr.ac.cr/revistaKuru/>
- Daquinta, M; Ramos, L; Capote, I; Lezcano, R; Rodríguez, R & Escalona, M. (2002). *Morfogénesis in vitro de Teca (Tectona grandis L.)*. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For* 11 (1).
- Daquinta, M; Ramos, L; Capote, I; Lezcano, Y; Rodríguez, R; Trina, D & Escalona, M. (2001). Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L.f.). *Revista Forestal Centroamericana* 35:25-28.
- Gamboa, J.P.; Abdelnour, A. (1999). Micropropagación de melina (*Gmelina arborea* ROXB). *Agronomía Costarricense* 23: 69-76.
- George, E.F.; Hall, M.A. & De Klerk, G. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Ed.
- Springer, The Netherlands. Pp. 183-186, 213-215.
- Gomes, G.; Paiva, R.; Herrera & Duarte, P. (2010). *Micropropagation de Maclura tinctoria L: a endangered woody species*. *R. Árvore* 34:25-30.
- Kan, M.I.; Ahmad, N. & Anis, M. (2011). *The role of cytokinins on in vitro shoot production in Salix tetrasperma Roxb.: a tree of ecological importance*. *Trees* 25:577-584.
- Kanan, V.R. & Jasrat, Y.T. 1996. Micropropagation of *Gmelina arborea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 46:269-271.
- Keogh, R.M. (1987). *The care and management of Teak (Tectona grandis L.f.) plantations*. A practical guide for foresters in the Caribbean, Central America, Venezuela and Colombia. Gorta, Irlanda y Universidad Nacional, Costa Rica. pp. 9.
- Montagnini, F. (2004). Plantaciones forestales con especies nativas: una alternativa para la producción de madera y la provisión de servicios ambientales. *Recursos Naturales y Ambiente* 43:28-35.
- Monteuuis, O; Bom, M.C. & Goh, DKS. (1998). Teak propagation by *in vitro* culture. *Bois et Forêts des Tropiques* 256:1-11.
- Murashige, T & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Murillo, O; Rojas, J.L; Barrantes, G; Badilla, Y; Jiménez, M & Mesén, F. (2001). Mejoramiento genético de la teca en Costa Rica. *Boletín Kurú*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. pp. 7-9.
- Tiwari S.K., Tiwari K.P. & Siril E.A. 2002. An improved micropropagation protocol for teak. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 1-6.
- Umboh, M.I.J. 1988. Tissue culture of some important tropical trees at Biotrop Laboratory. *Biotrop Spec. Publ* N° 35.
- Valverde, L. & Alvarado, L. 2004. Organogénesis *in vitro* en *Dalbegia retusa* (Papilionaceae). *Rev. Biol. Trop.* 52 : 41-46.