

Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L.F.)

La biotecnología...
un instrumento de rescate y preservación de la biodiversidad de los bosques tropicales.

Marcos Daquinta
Luis Ramos
Iris Capote
Yarianne Lezcano
Romelio Rodríguez
Danilo Trina
Maritza Escalona

RESUMEN

El rescate de especies de interés comercial es una de las líneas prioritarias de la biotecnología. Es una herramienta básica que apoya el mejoramiento de árboles élites, eleva la tasa de multiplicación y permite participar en programas de reforestación de áreas que tienen grandes problemas de deforestación. El rescate de especies también puede ayudar a mantener el equilibrio del ecosistema natural.

La teca (*Tectona grandis*) es una especie de alto interés comercial y ecológico por el rápido crecimiento y la calidad de su madera. No obstante, hoy padece un grave problema: la propagación por semillas dada su alta variabilidad genética. Por esta razón, se han buscado otras opciones de producción.

Para establecer la metodología de propagación *in vitro* se partió de explantes recolectados de árboles jóvenes y adultos. Se evaluaron diferentes concentraciones de citoquininas con el fin de estimular la emisión de brotes y auxinas para formar raíces *ex vitro*. Se logró establecer un protocolo para la propagación *in vitro*, con buenos resultados.

Palabras claves: *Tectona grandis*, micropropagación, cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Micropropagation in teak (*Tectona grandis* L.F.). The rescue of commercial species is a priority for biotechnology to increase multiplication rate and develop reforestation programmes in heavily deforested areas. Such programmes can be carried out simultaneously with the development of the country to maintain the ecosystem's natural equilibrium. Teak (*Tectona grandis*) is a forest tree of high commercial and ecological value because of its rapid growth and wood quality. Teak, however, is a species with problems for propagation as a result of its high genetic variability. For this reason, alternatives to produce propagules have been developed. *In vitro* propagation is one alternative and this paper points out a methodology from young and mature tree explants collected. Different cytokinins were tested for shoot proliferation and auxins for *ex vitro* rooting. An efficient procedure was established to micropropagate elite mature trees.

Key words: *Tectona grandis*; micropropagation; *in vitro* culture.

La necesidad de obtener recursos del bosque ha llevado al ser humano a explotarlo de forma irracional, sin pensar en las consecuencias. Hoy, sólo en el continente americano se pierden hasta 300 000 ha de bosque nativo por año (Centeno 1997). Toda esta situación ha obligado buscar nuevas opciones de reproducción vegetativa con altas tasas de multiplicación y buenas características, tanto fenológicas como morfológicas.

En esta búsqueda de nuevas posibilidades, la biotecnología surge como una herramienta que contribuye a la conservación de la biodiversidad genética y a la innovación de procedimientos tecnológicos; además, es un instrumento de rescate y preservación de la biodiversidad de los bosques tropicales.

En Malasia se desarrolló un protocolo para la micropropagación de varios miles de plantas de teca (*Tectona grandis*) basado en la técnica de propagación por microestacas que permite la producción industrial de vitroplantas clonadas a partir de genotipo de corta edad (Monteuuis 1994, Bon y Monteuuis 1996, Monteuuis *et al.* 1998). En Cuba no hay antecedentes de este trabajo.

El objetivo de la presente investigación fue establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de teca, a partir de árboles seleccionados.

Materiales y métodos

Inducción de rejuvenecimiento de yemas de teca

Se seleccionaron brotes epicórmicos de árboles de teca en el vivero forestal "El Cartucho", situado en la carretera a Morón Km 14, Ciego de Avila, Cuba.

Dichos brotes se cortaron y se colocaron en un vivero en macetas con sustratos de zeolita bajo un cobertor de polietileno transparente, con riego por microjet a una frecuencia de un minuto cada media hora. Esta cámara húmeda es muy similar a la utilizada para la aclimatización de plantas *in vitro*.

Las yemas brotadas de los árboles adultos se trataron con hormonas para el enraizamiento (ácido indol-3-butírico (AIB) + ácido naftalenacético (ANA)) y se colocaron en sustrato de zeolita, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para estacas de brotes epicórmicos. Como testigo se utilizaron brotes de plantas juveniles obtenidas de semillas y se trataron con las mismas hormonas de enraizamiento.

A los 30 días se evaluó el porcentaje de brotes enraizados, números de raíces y largo de raíz mayor.

Establecimiento *in vitro* de las yemas provenientes del material rejuvenecido

La desinfección de brotes de teca de 1 cm de longitud se realizó en una solución de bicloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,25% durante 10 minutos. Luego se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril. Los ápices se cortaron en el estéreo-microscopio, quedando los explantes con 2 mm de base y 4 mm de alto. Su implantación se realizó en el medio de cultivo Murashige y Skoog, (MS) con las siguientes variantes.

MS sin regulador de crecimiento

MS + 0,5 mg.L⁻¹ BAP

(Bencilaminopurina)

MS + 1 mg.L⁻¹ BAP

MS + 0,5 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ GA₃

MS + 1 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ GA₃

Tectona grandis L.F., especie forestal introducida de la India, ha logrado adquirir un alto valor ecológico y comercial por la calidad de su madera. Hoy, muchos países del primer mundo la importan por su betado y la utilizan para los acabados de cielo rasos, pisos, paredes, muebles, puertas, ventanas, etc. Este árbol es de crecimiento rápido, tiene fuste recto y cuenta con una alta resistencia al fuego en su estado natural.

Se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento. A los 45 días se procedió a evaluar el número de yemas contaminadas, fenolizadas y brotadas, así como el número de hojas por yemas y el porcentaje de explantes con callos en la base de las yemas.

Evaluación de diferentes concentraciones de BAP sola y combinada con Kinetina en la multiplicación de brotes de teca

Para efectuar este experimento se utilizaron plantas *in vitro* de yemas apicales. Las yemas fueron establecidas en MS suplementado con 1 mg.L⁻¹ BAP. Las plántulas de yemas apicales de árboles adultos seleccionados se cortaron en segmentos nodales hasta llegar al ápice y se establecieron en los siguientes medios:

MS +1 mg.L⁻¹ BAP

MS +1,5 mg.L⁻¹ BAP

MS +2 mg.L⁻¹ BAP

MS +1 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg. L⁻¹Kinetina

MS +1,5 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg. L⁻¹Kinetina

MS +2 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg. L⁻¹Kinetina

Se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento. A las seis semanas se evaluó el número de brotes emitidos por explantes, tanto por los ápices como por los nudos.

Inducción del enraizamiento *ex vitro* con polvos enraizadores

Se utilizaron brotes de 1,5 a 2 cm de altura y 2-3 pares de hojas del medio de cultivo MS con 10 mg.L⁻¹ de sacarosa y 1mg.L⁻¹ de carbón activado. Éstos fueron tratados con polvos enraizadores para estimular el enraizamiento *ex vitro*. Luego se colocaron en un sustra-

to de zeolita, bajo túnel, con un sistema de riego por microjet, y una frecuencia de 30 seg. cada 30 min. Se establecieron 40 microestacas en cada uno de los siguientes tratamientos:

- Sin polvo enraizador
- Con polvo enraizador (1 000 mg.L⁻¹ ANA + 1 000 mg.L⁻¹ AIB)
- Con polvo enraizador (2 000 mg.L⁻¹ ANA + 2 000 mg.L⁻¹ AIB)

Se utilizó un diseño completamente al azar con 40 repeticiones. A las cuatro semanas se evaluaron los brotes enraizados, el número de raíces emitidas y longitud de la raíz mayor.

Resultados y discusión

Inducción de rejuvenecimiento de yemas de teca

El cuadro 1 indica el comportamiento del enraizamiento *ex vitro* de las yemas brotadas provenientes de árboles adultos. Se logró un alto porcentaje de enraizamiento de estas yemas, lo que mostró el rejuvenecimiento del material de árboles adultos. Al compararse con los brotes de plantas juveniles de semillas (que es material totalmente joven) se observó que no hubo diferencias estadísticas.

Entre las estrategias recomendadas para la inducción del rejuvenecimiento en material adulto en teca, Guerrero *et al.* (1992) han evaluado la utilización de rebrotes provenientes de tocones y la selección de chupones y brotes de la parte baja del tronco con características juveniles. Por su parte Castro *et al.* (1999) únicamente utilizaron rebrotes provenientes de tocones.

Cuadro 1. Comportamiento del enraizamiento de yemas brotadas provenientes de árboles adultos y brotes de plantas juveniles de teca. Medias con letras desiguales difieren para un valor de *p* < 0,05, en Cuba.

Tratamientos	Enraizamiento %	No de raíces	Largo de la raíz mayor (cm)
Yemas brotadas de árboles adultos	100	2	6,3 a
Brotes de plantas juveniles	100	2,6	5,3 b

La inducción del crecimiento de yemas axilares dormante en estacas colocadas en cámaras húmedas ha sido referida por Guerrero *et al.* (1992) para *Tabebuia rosea*. Sin embargo, dichos autores descartaron este método por la lentitud en el desarrollo de las yemas generadas en cámaras húmedas. En esta investigación no se presentó el problema del desarrollo lento de las yemas ya que las estacas fueron de brotes epicórmicos que tienen más vigor.

El comportamiento recalcitrante de los tejidos de material adulto se atribuyó a la pérdida de juvenilidad, la cual condujo a la disminución de la capacidad morfogenética representada en la tasa de crecimiento reducido y en la dificultad para el desarrollo de raíces, esto último ocasionado por la presencia de inhibidores del enraizamiento (Muhitch y Fleycher 1985).

Se logró el 100% de enraizamiento de las yemas de brotes epicórmicos, un buen indicador del rejuvenecimiento alcanzado en este material (Cuadro 1).

Los resultados del enraizamiento de yemas de árboles adultos permiten, si se considera necesario, hacer operativo y confiable el sistema de macropropagación, una alternativa que se puede manejar de forma paralela y complementaria a los programas de clonación y establecimiento de huertos semilleros clonales.

Establecimiento *in vitro* de las yemas provenientes del material rejuvenecido

En el cuadro 2 se observa el comportamiento de la brotación. En los medios de cultivo suplementados con 0,5 y 1 mg.L⁻¹ de BAP se logró la máxima respuesta y aunque el 83% de los explantes formaron callos en su base, el desarrollo de éstos se comportó por debajo de los medios de cultivo suplementados con GA₃. Y, aunque en el medio sin reguladores del crecimiento no se formaron callos en la base del explante, sí se comprometió la brotación.

Al evaluar la contaminación microbiana se logró siempre más del 90% de brotes sin contaminantes visibles, lo que indicó que el procedimiento de desinfección fue efectivo.

Cuadro 2. Influencia de los medios de cultivo en el establecimiento de los ápices de teca. Medias con letras desiguales difieren para un valor de $p < 0,05$.

Tratamiento	% Brotación	No de Hojas	% callo (crecimiento)
MS	33 b	2 b	- b
MS+0,5 mg/LBAP	100 a	4,6 a	83 (++) a
MS+1mg/LBAP	100 a	4,8 a	83 (+) a
MS+0,5 mg/LBAP+ 1 mg/ LGA ₃	62,5 ab	2 b	75 (+++) a
MS+1 mg/LBAP+ 1 mg/ L GA ₃	33 b	1,3 b	66 (++) a
ES	0,15	0,13	0,16

Donde, + poco crecimiento, ++ medio crecimiento, +++ abundante crecimiento.

Con relación a la fenolización no se observaron brotes fenolizados ya que la producción de polifenoles en estos brotes (provenientes de zonas en activo crecimiento) es mínima.

Lo anterior coincide con lo señalado en la literatura, donde se plantea que la mayor producción de fenoles está en los tejidos diferenciados de la planta (Carrizosa *et al.* 1994). Los tejidos adultos (zona basal) de especies leñosa, particularmente de Angiospermas, liberan al medio de cultivo pigmentos constituidos sobretodo por polifenoles y taninos.

La síntesis de los precursores de fenoles es más activa y compleja en tejidos maduros que en tejidos jóvenes, y está directamente influenciada por el contenido de sales y reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (Muhitch y Fletcher 1985). Estos autores señalan que el control de las oxidaciones puede lograrse mediante:

- pre-tratamientos de inmersión de los explantes en soluciones que contienen antioxidantes,
- reducciones en la concentración de sales en el medio,
- por cultivos de explantes de las zonas en estado de crecimiento activo, y
- realizando adecuadamente subcultivos frecuentes.

A pesar de trabajar con yemas y nudos provenientes de chupones o rebrotes de tocones Guerrero *et al.* (1992), Carrizosa *et al.* (1994) y Castro *et al.* (1999), encontraron problemas de oxidaciones. En esta investigación no se observaron explantes fenolizados porque se trabajó con las nuevas brotaciones de yemas axilares dormantes de estacas de brotes epicórmicos colocadas en cámaras húmedas.

Evaluación de diferentes concentraciones de BAP sola y combinada con Kinetina en la multiplicación de brotes de teca

En el cuadro 3 se muestra el comportamiento del número de brotes emitidos en los segmentos apicales. Se encontró de forma general una mayor respuesta en los tratamientos donde se utilizó la combinación de dos citoquininas. Los tratamientos donde se utilizaron las mayores concentraciones de BAP presentaron un mejor comportamiento. Cuando se analizó la respuesta en los segmentos nodales se observó, al igual que en los explantes analizados (ápices), un mayor número de brotes emitidos en aquellos donde se combinaron la BAP y la Kinetina. A diferencia de los segmentos apicales, en este tipo de explante el mayor número de los brotes se obtuvo en la menor concentración de BAP,

Cuadro 3. Evaluación de diferentes niveles de BAP sola y combinada con Kinetina en la multiplicación de brotes de teca. Medias con letras desiguales difieren para un valor de $p < 0,05$. en Cuba

Tratamientos	Apices	Nudos
MS+1 mg.L ⁻¹ BAP	1,4 b	2 c
MS+1,5 mg.L ⁻¹ BAP	1,6 b	2,7 c
MS+2 mg.L ⁻¹ BAP	1,1 b	4,2 a
MS+1 mg.L ⁻¹ BAP+0,5 mg. L ⁻¹ Kinetina	1 b	4,3 a
MS+1,5 mg.L ⁻¹ BAP+0,5 mg. L ⁻¹ Kinetina	2,4 a	3,4 b
MS+2 mg.L ⁻¹ BAP+0,5 mg. L ⁻¹ Kinetina	2,6 a	2,3 c
Error Estándar	0,15	0,18

combinada con 0,5 mg/L de Kinetina. Aquí la respuesta estuvo más determinada por la menor concentración de citoquininas y no por la mayor concentración, como sucedió en los ápices.

Comportamientos similares han sido indicados por Nadgauda (1997) y Kendurkar *et al.* (1999), aunque con concentraciones menores de citoquininas mantienen una relación BAP-Kinetina similar a la que presentó una mejor respuesta en este trabajo. Dichos investigadores utilizaron 0,2 mg.L⁻¹ de BAP y 0.1 mg.L⁻¹ de Kinetina; es decir, mantuvieron una relación de 2:1

Inducción del enraizamiento *ex vitro* con polvo hormonal en microestacas de teca

La figura 1 muestra el comportamiento del enraizamiento *ex vitro* de las microestacas de teca del medio de cultivo MS suplementado con 10 g.L⁻¹ de sacarosa y 0,1% de carbón activado. Los explantes tratados con el polvo enraizador a 1000 mg.L⁻¹ de ANA y 1000 mg.L⁻¹ AIB fueron los que presentaron mayor porcentaje de enraizamiento (92,5%). Esta respuesta disminuye con el incremento de las concentraciones en el polvo enraizador.

Castro *et al.* (1999) lograron menos del 10% de enraizamiento sin el empleo de polvo. Estos resultados son inferiores si se comparan con los de

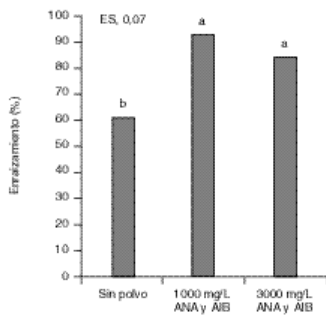


Figura 1. Evaluación del enraizamiento *ex vitro* con polvos hormonales.

esta investigación; sin embargo este hecho puede estar determinado por la procedencia de las microestacas. En este trabajo los explantes provenían de un medio de cultivo suplementado con carbón activado, lo que favorece la inducción de las raíces *ex vitro*.

El uso de polvos enraizadores con mezcla de auxina (ANA y AIB) posibilitan obtener porcentajes de enraizamiento superiores a los señalados por Castro *et al.* (1999), aspecto que está relacionado con el papel del ANA como inductor y del AIB en la diferenciación morfológica del enraizamiento.

Al analizar el comportamiento del número de raíces y la longitud de la raíz mayor (Cuadro 4) se encontró que estas variables se comportan mejor en las microestacas que se trataron con polvo enraizador. Los explantes tratados con 1000 mg.L⁻¹ ANA y 1000 mg.L⁻¹ AIB tuvieron más raíces y mayor longitud. Por lo contrario, las microestacas que no fueron tratadas con polvo inductor del enraizamiento mostraron menos raíces y fueron más cortas.

Un método simple y eficiente para el enraizamiento de microestacas directamente en el suelo fue desarrollado para especies de eucalipto y teca por Nadgauda (1999), dicho método incluye la selección de las microestacas, inmersión del extremo en una solución para estimular el desarrollo de raíces y la transferencia al sustrato de enraizamiento y el endurecimiento tuvo lugar simultáneamente, resultando en la reducción en el número de pasos, labor y tiempo.

Resultados

1. Se obtuvo el 100% de enraizamiento de las yemas de los árboles adultos que estaban en cámaras húmedas con sustrato de zeolita.
2. Se logró el 100% de brotación de los ápices de brotes epicórnicos en el medio MS suplementado con 0,5 mg L⁻¹ de BAP.

3. El mejor medio para multiplicar los brotes fue el MS con 1 mg L⁻¹ de BAP y 0,5 mg L⁻¹ de Kinetina.
4. Se logró el enraizamiento *ex vitro* con polvos hormonales, bajo cobertor.

Marcos Daquinta,
 Centro de Bioplasmas. Carretera de Ciego
 a Morón Km.9.Ciego de Avila. C.P:
 69.450 Cuba.
 Tel y fax: (53)33266340
 Correo electrónico:
 mdaquinta@unica.edu.cu

Luis Ramos, Investigador
 migluisramos@yahoo.es
 Iris Capote, Técnica de laboratorio
 Yarianne Lezcano, Técnica de laboratorio
 Romelio Rodríguez, Investigador
 bioclima@bioca.unica.cu
 Danilo Trina, Técnico de laboratorio
 Maritza Escalona, Investigador
 mescalona@bioca.unica.cu.

Literatura citada

Bon, M.; Monteuis, O. 1999. Biotechnologies forestieres on Sabah. Premier bilan. Bois et Forests des Tropiques 248:32-42.

Carrizosa, M; Ramirez, C; Guerrero, E; Santamaria, LM; Hodson de Jaramillo, E. 1994. Cultivo de tejidos para la propagación y mejoramiento de especies forestales. In Memorias del III Congreso. Bogotá, Pontifice Universidad Javierana. t.2, p. 547-559.

Castro, D; Diaz, J.J; Murillo, M.V. 1999. Estrategias de trabajo para la multiplicación clonal *in vitro* de árboles adultos de Teca (*Tectona grandis*), Melina (*Gmelina arborea*) Roble (*Tabebuia rosea*). Informe Final de Asesoría Técnica. Rionegro, Colombia. p. 16-51.

Centeno, J.C. 1997. The management of Teak plantations. ITTO Tropical Forest Update 7(2): 1-5.

Guerrero, E; Hodson de Jaramillo, E; Santamaria, LM; Ramirez, C; Carrizosa, M. 1992. Manejo *in vitro* de material adulto de especies forestales. In Memorias del II Congreso. Bogotá, Pontifice Universidad Javierana. t.1, p. 481-487.

Kendurker, S.V; Nadaganda, R.S; Von Arnold, S. 1999. Studies on cryopreservation of Teak (*Tectona grandis*) a tropical hard wood tree (Abstracts) In International Tree Biotechnology Meeting, India. p. 53-57.

Monteuis, O. 1994. Recent advances in mass clonal propagation of Teak. In Proceeding International Workshop Bio-Refor, Kangar, Malaysia. p. 117-121.

Monteuis, O; Bon, M; Goh, D. 1998. Teak propagation by *in vitro* culture. Bois et Forets des Tropiques 226(2):1-11.

Muhitch, M.J; Fleycher, J.S. 1985. Influence of culture age and spermidine-treatment on the accumulation of phenolic compounds in suspension cultures. Plant Physiology. 78: 25-28.

Nadgauda, R.S. 1999. Application of tissue culture in clonal forestry programme. In Abstracts of International Tree Biotechnology Meeting, India. p. 4-8.

Cuadro 4. Comportamiento del número de raíces y longitud de la raíz mayor en el enraizamiento *ex vitro*. Medias con letras desiguales difieren entre sí para el test de Duncan, (*p* < 0.05) en Cuba.

Tratamientos	Números de raíces	Longitud raíz
Sin polvo	1 b	1 c
1000 mg.L ⁻¹ ANA+ 1000 mg.L ⁻¹ AIB	2 a	3,8 a
2000 mg.L ⁻¹ ANA+ 2000 mg.L ⁻¹ AIB	1,8 a	2,8 b
Error Estándar	0,15	0,11