

## Establecimiento *in vitro* de brotes apicales de *Pinus caribaea* var. *caribaea*

Manuel de Feria, Maité Chávez, Raúl Barbón, Mariana La O, Marta Pérez, Felipe Jiménez-Terry, Elisa Quiala, Daniel Agramonte. \*Autor para la correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e.mail: mdeferia@ibp.co.cu

### RESUMEN

Con el objetivo de establecer *in vitro* brotes apicales de *Pinus caribaea* var. *caribaea* se estudiaron dos tipos de brotes con diferentes características morfológicas, los cuales fueron utilizados con aproximadamente 20 días de brotados en plantas cultivadas en un banco de donantes en casa de cultivo. Los resultados demostraron que la respuesta *in vitro* del brote tipo (B) fue superior al brote tipo (A) para todas las variables evaluadas, aun incluso cuando este último tipo de brote fue empleado con 35 días de brotado. Los brotes tipo (B) presentaron una supervivencia del 90%, el menor porcentaje de brotes dañados (13.3%) y un 96.3% de brotes desarrollados. Al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP (0.0; 2.22; 4.44; 6.66 y 8.88  $\mu\text{M}$ ) también en la fase de establecimiento *in vitro*, pero sólo con brotes tipo (B) se observó que con 6.66  $\mu\text{M}$  de 6-BAP se logró la mayor longitud de los brotes (2.58 cm) y el mejor porcentaje de brotes con yemas axilares engrosadas (70%), característica esta última muy importante para la posterior respuesta de los brotes en la fase de multiplicación.

Palabras clave: 6-BAP, pino, reguladores del crecimiento

### ABSTRACT

Two shoots types with different morphological characteristics and approximately after 20 days of sprouting from plants cultivated in a donors bank in greenhouse were studied in this research with the objective of establishing *in vitro* apical shoots of *Pinus caribaea* var. *caribaea*. Results demonstrated that the *in vitro* response of shoots type (B) was superior to shoots type (A) for all the evaluated variables, even when last shoot type was used with 35 days of sprouting. Shoots type (B) presented a 90% of survival, the smallest percentage of damaged shoots (13.3%) and 96.3% of developed shoots. Effect of different concentrations of 6-BAP (0.0; 2.22; 4.44; 6.66 and 8.88  $\mu\text{M}$ ) with shoots type (B) in the *in vitro* establishment phase was evaluated. Results showed that using 6.66  $\mu\text{M}$  6-BAP the biggest longitudes in shoots (2.58 cm) and the best percentage of them with augmented axillary buds (70%) were achieved. The last characteristic is very important for the later response of the shoots in the multiplication phase.

Key words: 6-BAP, growth regulators, pine

### INTRODUCCIÓN

*Pinus caribaea* var. *caribaea* es una especie endémica de la región occidental de Cuba, específicamente de la Provincia de Pinar del Río y del Municipio especial Isla de la Juventud, a finales del 2006 y debido a la reducida área de plantación que ocupaba, fue clasificada como una especie vulnerable en la lista roja publicada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN, 2006).

Económicamente resulta importante por su producción de madera y resina, aunque se han desarrollado metodologías para la obtención, además, de cera conífera, pasta clorofila-caroteno y residuo forrajero a partir del empleo del follaje después de la tala (Díaz *et al.*, 2007).

La Empresa Forestal en Cuba la propaga de manera tradicional a partir de la siembra de semillas en viveros y el posterior trasplante a

campo de las posturas. El empleo de técnicas de cultivo *in vitro* ha constituido una vía alternativa para la propagación de diferentes especies vegetales. En el caso de la regeneración de plantas por organogénesis este ha demostrado ser un método eficiente incluso a escala comercial y podría favorecer la propagación de los nuevos clones de dicha especie, descritos por Pérez *et al.* (1999) que han sido obtenidos mediante rigurosos trabajos de selección y mejoramiento genético durante varios años.

En pino se han desarrollado muchos trabajos para su propagación *in vitro*, la mayoría emplearon embriones cigóticos inmaduros y maduros como material vegetal inicial para la formación de callos (Nehra *et al.*, 2005; Lelu *et al.*, 2006; Pullman y Skryabina, 2007), a partir de los cuales, se han obtenido diferentes protocolos para la regeneración de plantas por organogénesis (Tang *et al.*, 2004; Tang y Newton, 2005) y embriogénesis somática (Maruyama *et al.*, 2007; Vales *et al.*, 2007).

Sin embargo, el empleo de brotes apicales, yemas axilares, acículas, etc., para el establecimiento *in vitro* de plantas de pino han sido alternativas menos estudiadas, debido fundamentalmente a los bajos coeficientes de multiplicación que se han obtenido en muchas de las especies estudiadas al comparar este sistema de regeneración con la embriogénesis somática y por la existencia, además, en el mercado internacional de un amplio programa para la oferta de embriones cigóticos de los principales materiales vegetales cultivados comercialmente, pero a los cuales Cuba no tiene acceso.

Es por ello, que disponer de un protocolo para la propagación *in vitro* de brotes apicales a partir de material vegetal revigorizado, podría resultar una alternativa importante en particular para clones mejorados a partir del *Pinus caribaea* var. *caribaea*.

Por todo lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo lograr el establecimiento *in vitro* de brotes apicales de *Pinus caribaea* var. *caribaea* a partir de un banco de plantas donantes cultivadas en casa de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Establecimiento *in vitro*

Brotes apicales de *Pinus caribaea* var. *caribaea* con aproximadamente 3.0 cm de longitud fueron cortados cada 10 días y durante un mes, de diferentes plantas del banco de donantes del IBP, en horas tempranas de la mañana y se colocaron en 200 ml de una solución estéril de ácido cítrico con una concentración de 500 mg.l<sup>-1</sup>.

En el laboratorio, los brotes fueron lavados con detergente comercial (2.0 g.l<sup>-1</sup>) y agua común, el enjuague se realizó con una solución de ácido cítrico similar a la descrita anteriormente. Como agente desinfectante se empleó el Hipoclorito de

sodio al 2.0% y los brotes se expusieron a su acción durante 20 minutos en un agitador orbital a una velocidad constante de 180 rpm.

Trascurrido este tiempo, se realizaron en una cabina de flujo laminar tres enjuagues con la solución de ácido cítrico y antes de ser colocados los brotes en los tubos de ensayo, se eliminó la parte de la base que se afectó por la acción del Hipoclorito de sodio.

El medio de cultivo basal estuvo compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Coke (1996), a las cuales se hará referencia en lo adelante como WV3, se adicionaron además 1.0 g.l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0.4 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 1.0 g.l<sup>-1</sup> de L-glutamina, 3.0 g.l<sup>-1</sup> de carbón activado, 20 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y 2.5 g.l<sup>-1</sup> de gelrite.

Se dosificaron 10 ml de medio de cultivo por tubo de ensayo y se esterilizaron durante 15 minutos en autoclave a 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> y 121°C. Los experimentos fueron repetidos tres veces en el tiempo y la temperatura de la cámara de crecimiento fue de 28 ± 2.0°C, con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos entre 38-47.5 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Para el procesamiento estadístico se utilizó el paquete SPSS para Windows versión 16.0, los niveles de significación se determinaron por un análisis de varianza simple (ANOVA), y la diferencia entre los valores medios fue comparada usando la prueba de rangos múltiples de Duncan, mientras que, para las variables expresadas en porcentajes, la diferencia entre los valores se determinó mediante la prueba de proporción para dos muestras Pd > 0.05, con el paquete estadístico STATISTIX versión 1.0.

### Selección del tipo de brote apical

Se evaluó la respuesta *in vitro* en la fase de establecimiento de dos tipos de brotes apicales de diferentes características morfológicas (Figura 1).



Figura 1. Diferentes tipos de brotes apicales de *Pinus caribaea* var. *caribaea* con aproximadamente 3.0 cm de longitud, obtenidos de plantas del banco donante del IBP a los 20 días de cultivo.

El brote tipo (A) se caracterizó por tener un color verde más intenso, mayor número de acículas y una menor distancia de inserción al tallo entre las acículas, mientras que, el brote tipo (B) en comparación con el anterior, presentó un color verde menos intenso, un menor número de acículas en igual longitud de tallo y por consiguiente una mayor separación entre las acículas (Figura 1).

Para este experimento, al medio de cultivo basal descrito anteriormente se le adicionaron 4.44  $\mu\text{M}$  de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y a los 30 días de cultivo *in vitro* se evaluó la supervivencia de los brotes, el número de brotes con algún tipo de afectación o daño y el número de brotes que no se desarrollaron.

Como brotes muertos se consideraron aquellos que se necrosaron completamente. Con algún tipo de daño se consideraron aquellos que presentaron necrosis aproximadamente de más de un 25% de la superficie del brote y como brotes que no desarrollaron se consideraron aquellos que a los 30 días de cultivo, a pesar de no morir y aunque presentaron o no afectaciones por necrosis, se mantuvieron en estado latente, es decir, sin cambios en su longitud, ni engrosamiento, así como en la brotación o engrosamiento de sus yemas axilares.

### Efecto del 6-BAP

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP en la respuesta *in vitro* de los brotes apicales tipo (B) durante la fase de establecimiento. Los tratamientos fueron 0.0; 2.22; 4.44; 6.66 y 8.88  $\mu\text{M}$  de 6-BAP y se colocaron un total de 30 brotes apicales por tratamiento. Las evaluaciones se realizaron a los 30 días de cultivo y se determinó la longitud de los brotes (cm), el número de brotes con yemas axilares engrosadas y con yemas axilares brotadas.

### RESULTADOS

#### Selección del tipo de brote apical

Los brotes tipo (B) presentaron las mejores respuestas *in vitro* durante la fase de establecimiento (Figura 2). Este tipo de brote mantuvo prácticamente durante los 20 días de brotado en la casa de cultivo, las mismas características morfológicas que antes fueron mencionadas y que se observaron en la fig. 1.

Por el contrario, los brotes tipo (A), variaron en sus características morfológicas y luego de 30 días de cultivo, fue que este tipo de brote (A3) (Figura 3) pudo ser utilizado para el establecimiento *in vitro*.

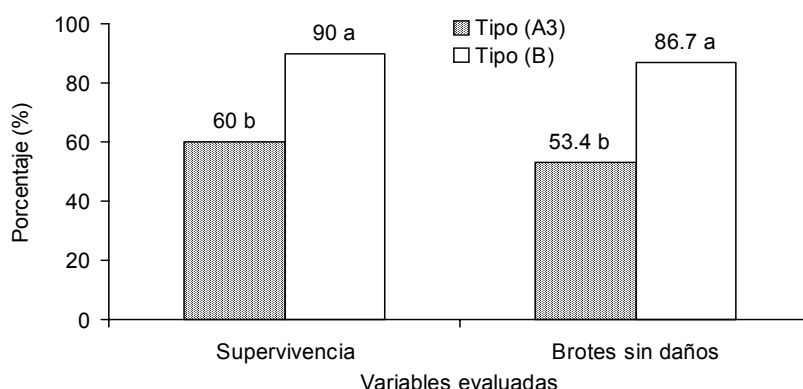


Figura 2. Respuesta *in vitro* de brotes de *Pinus caribaea* var. *caribaea* después de 30 días de cultivo en la fase de establecimiento en función del tipo de brote seleccionado inicialmente.

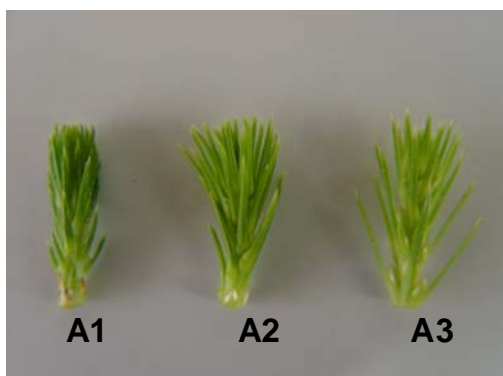


Figura 3. Diferentes características en el desarrollo del brote tipo (A) desde que brota hasta que transcurren 35 días de cultivo y puede ser empleado para su establecimiento *in vitro*.

Al evaluar el número de brotes que no presentaron desarrollo, en el tipo (B) se encontró sólo un 3.7% y un 96.3% de brotes desarrollados, tratamiento este con diferencias estadísticas significativas respecto a la respuesta *in vitro* de los brotes tipo (A3) donde sólo presentaron desarrollo el 76.7% de los brotes.

Por el contrario, cuando se emplearon brotes tipo (A1) con 20 días de brotados y tipo (A2) con 28 días de brotados (Fig. 3), se produjo su muerte en la fase de establecimiento o mostraron daños por necrosis, que al parecer son irreversibles pues se incrementaron paulatinamente hasta que el brote finalmente murió durante el 1er. subcultivo de multiplicación.

### Efecto del 6-BAP

El mejor tratamiento para el establecimiento *in vitro* y desarrollo de los brotes de *P. caribaea* var. *caribaea* se logró con una concentración de 6.66  $\mu$ M de 6-BAP. En este tratamiento las plantas *in vitro* alcanzaron la mayor longitud (Figura 4) y el mayor porcentaje de brotes con yemas axilares engrosadas (Tabla 1).

Sin embargo, hasta los 30 días de cultivo no se observaron brotes apicales con yemas axilares brotadas, pero sí con yemas engrosadas (Figura 5) respuesta muy importante para el desarrollo de nuevos brotes durante la fase de multiplicación.

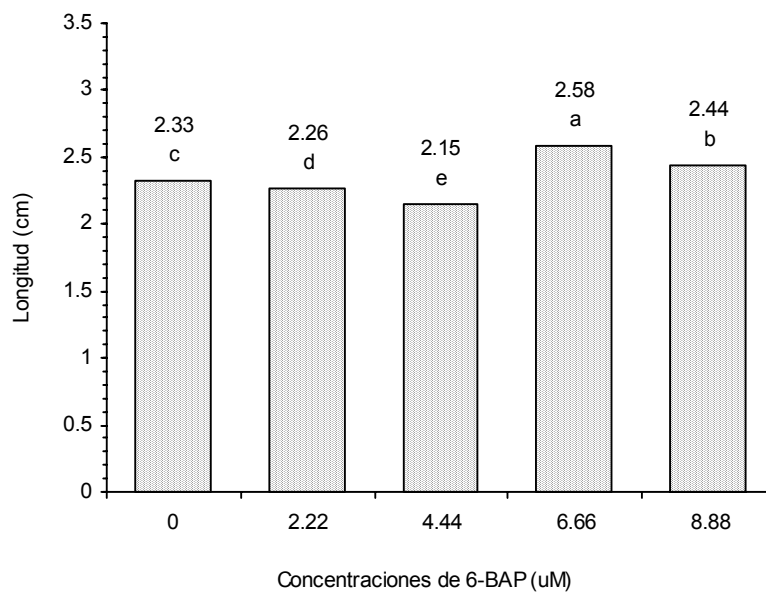


Figura. 4 Longitud promedio (cm) de brotes apicales de *Pinus caribaea* var. *caribaea* establecidos *in vitro* después de 30 días de cultivo en diferentes concentraciones de 6-BAP.

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP en la respuesta *in vitro* de brotes de *Pinus caribaea* var. *caribaea* después de 30 días de cultivo.

| Concentración de 6-BAP ( $\mu$ M) | Brotes con yemas axilares engrosadas (%) |
|-----------------------------------|--|
| 0.0                               | 46.6 c                                   |
| 2.22                              | 23.3 d                                   |
| 4.44                              | 50.0 b                                   |
| 6.66                              | 70.0 a                                   |
| 8.88                              | 46.6 c                                   |

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para  $p < 0.05$  según la Prueba de proporciones.



Figura 5. Brotes de *Pinus caribaea* var. *caribaea* después de 30 días de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro* con una concentración de 6.66  $\mu$ M de 6-BAP, obsérvese la presencia de yemas axilares engrosadas.

## DISCUSIÓN

La propagación *in vitro* a partir de árboles adultos siempre ha sido difícil debido a problemas tales como el establecimiento de cultivos asépticos (alta contaminación microbiana), la influencia de la época del año en la respuesta *in vitro*, o a la acumulación de determinados metabolitos secundarios que provocan fenolización (Quraishi y Mishra, 1998; Agrawal *et al.*, 2002).

Según Korban y Sul (2007), en algunas especies de coníferas las plantas obtenidas de semillas pueden servir como plantas madre en casas de cultivo y ser fuentes de material vegetal, si se mantienen y crecen bien, ya que proporcionan gran cantidad de nuevos brotes como material vegetal para establecer *in vitro*.

En varias especies e híbridos del género *Larix*, un árbol conífero que se caracteriza por su rápido crecimiento, Ewald (2007) empleó plantas de semilleros para obtener los brotes que finalmente estableció *in vitro*.

En el presente estudio, los brotes apicales establecidos *in vitro* no fueron tomados de plantas adultas, sino de plantas obtenidas de semillas. No obstante, el origen del material vegetal, el protocolo desarrollado permitirá tener éxito cuando se revigoricen estaquillas de árboles adultos de la misma especie seleccionados por sus buenas características.

El propio Ewald (2007) también demostró que fue posible establecer plantas *in vitro* a partir de árboles adultos pero al final del invierno ya que por la pérdida de las agujas en esa época del año se facilitó y fue más efectiva la desinfección del material vegetal.

Entre los reguladores del crecimiento en plantas, las citoquininas han sido las que mejores

respuestas han permitido obtener durante el establecimiento *in vitro* de muchas especies vegetales. En árboles adultos de *Holarrhena antidysenterica*, Kumar *et al.* (2005) estudiaron el efecto de varias citoquininas en el establecimiento y multiplicación *in vitro* de los brotes y las mejores respuestas las lograron con N<sup>6</sup>-benciladenina (BA).

Estos autores al evaluar, además, el efecto de diferentes concentraciones de BA comprobaron que al igual que en muchas otras especies, las respuestas *in vitro* para la mayoría de las variables evaluadas dependieron de las concentraciones estudiadas.

Una respuesta similar, pero con 6-BAP como regulador del crecimiento se logró en el presente trabajo donde tanto para la longitud de los brotes como para el porcentaje de brotes con yemas axilares engrosadas, la respuesta estuvo determinada por la concentración de 6-BAP estudiada.

## CONCLUSIONES

Como resultado del trabajo realizado se definieron las características morfológicas que deben presentar los brotes apicales de *Pinus caribaea* var. *caribaea* con lo cual se puede lograr hasta un 86.6% de establecimiento y disponer así de plantas para desarrollar las fases de multiplicación y enraizamiento con el objetivo de cerrar el ciclo para la propagación *in vitro* de esta especie.

## REFERENCIAS

- Agrawal, V, Prakash S, Gupta SC (2002) Effective protocol for *in vitro* shoot production through nodal explants of *Simmondsia chinensis*. Biol. Plant 45: 449 - 453
- Coke, JE (1996) Basal nutrient médium for *in vitro* cultures of loblolly pine. U.S. Pat. No. 0,553,4434 patent. Jul. 9, 1996
- Conifer Specialist Group (1998) *Pinus caribaea* var. *caribaea*. 2006 Lista Roja de Especies Amenazadas IUCN. IUCN 2006.

[en línea]. Disponible en: [www.iucn.org/themes/ssc/sgs/plants.htm](http://www.iucn.org/themes/ssc/sgs/plants.htm). [Consultado el 19 de noviembre de 2007]

Díaz, S, Alessandrini M, Herrera A (2007) Comportamiento del follaje de *Pinus caribaea* var. *caribaea* y *Pinus tropicalis* en el desarrollo de una metodología para la obtención de cera conifera, pasta clorofila-caroteno y residuo forrajero a escala de banco. [en línea]. Disponible en: <http://www.uo.edu.cu/ojs/index.php/cq/article/view/14407125/167>. [Consultado el 22 de noviembre 2007]

Ewald, D (2007) Micropropagation of *Larix* species via organogenesis. En: Jain, SM y Häggman H (Eds) Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits, pp. 125-136. Springer, Dordrecht.

Korban, SS, Sul IW (2007) Micropropagation of coast Redwood (*Sequoia sempervirens*) En: Jain, SM y Häggman H (Eds) Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits, pp. 23-32. Springer, Dordrecht

Kumar, R, Sharma K, Agrawal V (2005) *In vitro* clonal propagation of *Holarrhena antidysenterica* (L.) Wall through nodal explants from mature trees. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41: 137-144

Lelu, MA, Michele W, Klimaszewska K (2006) Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). *Plant Cell Report* 25: 767-776

Maruyama, E, Hosoi Y, Ishii K (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endemic and endangered species in Japan. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 43: 28-34

Nehra, NS, Becwar MR, Rottmann WH, Pearson L, Chowdhury K, Chang S, Wilde HD, Kodrzycki RJ, Zhang C, Gause KC, Parks DW, Hinchee MA (2005) Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41: 701-717

Pérez, MH, González A, Echevarría P (1999) Avances en la mejora genética de *Pinus caribaea* Mor. var. *caribaea* Barret y Golfari, en la República de Cuba. Segundo Simposio sobre Avances en la Producción de Semillas Forestales en América Latina. República Dominicana del 18-22 de octubre.

Pullman, GS, Skryabina A (2007) Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Report* 26: 873-887

Quraishi, A, Mishra SK (1998) Micropropagation of nodal explants from adult tree of *Cleistanthus collinus*. *Plant Cell Report* 17: 430 - 433

Tang, W, Newton RJ (2005) Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Report* 24: 1-9

Tang, W, Harris LC, Outhavong V, Newton RJ (2004) Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Cell Report* 22: 871-877

Vales, T, Feng X, Ge L, Xu N, Cairney J, Pullman GS, Peter GF (2007) Improved somatic embryo maturation in loblolly pine by monitoring ABA-responsive gene expression. *Plant Cell Report* 26: 133-143