

Organogénesis *in vitro* en *Dalbergia retusa* (Papilionaceae)

Lisette Valverde Cerdas¹ & Laura Alvarado Guzmán²

1 INISEFOR, UNA. Apdo. 86-3000. Heredia, Costa Rica. Telefax: (506) 237 41 51.

2 Laboratorio de Histopatología. Escuela de Medicina Veterinaria; lvalverd@una.ac.cr.

Recibido 02-V-2002. Corregido 21-VIII-2003. Aceptado 17-IX-2003.

Abstract: Plants were obtained via organogenesis from hypocotyl explants of *Dalbergia retusa* from *in vitro* germinated seedlings. Adventitious bud induction was achieved on Murashige and Skoog medium containing five BA (benzyladenine) concentrations. The best BA concentration for budding induction and budding development was 8.8 μ M. Shoot rooting was obtained on half-strength modified MS basal medium, supplemented with 20g.l⁻¹ of sucrose and five concentrations of indole-3-butyric acid (IBA). The highest number of shoot rooting was obtained with 19.7 μ M IBA but the highest average number of roots for plantlet was achieved with 24.6 μ M IBA. Plants were transferred to greenhouse conditions.

Key words: *Dalbergia retusa*, micropropagation, wood species, Papilionaceae, cocobolo.

El cocobolo (*Dalbergia retusa* Hemsl.) es una especie maderable valiosa que crece desde el suroeste de México hasta el noroeste de Colombia sobre la costa del Pacífico (Carpio 1992). Posee una madera muy fina, con diferencia de coloración entre la albura y el duramen (Holdridge *et al.* 1997) que se clasifica como excesiva a extremadamente pesada (Carpio 1992), y excepcionalmente resistente con propiedades insecticidas (Geilfus 1989), alelopáticas y fungicidas (Rodríguez 2001). Sus usos son muy diversos y van desde la fabricación de muebles, instrumentos científicos, musicales y deportivos hasta la fabricación de accesorios para maquinaria pesada (Carpio 1992, Anónimo 1998).

Es una especie heliófita que crece bien en sitios abiertos con bosque poco denso y su regeneración dentro del bosque es escasa (Anónimo 1998). Sus semillas son atacadas por insectos de la familia Bruchidae, *Ctenocolum salvini*, que depositan sus larvas en los frutos jóvenes (Anónimo 1997, 1998). En Costa Ri-

ca, ha sido una especie ampliamente explotada por lo que se encuentra amenazada con un alto riesgo de pasar a la categoría de especie en peligro de extinción (Jiménez 1997). Dada su importancia económica y ecológica para nuestro país, esta especie ha sido definida como de acción prioritaria y se cuenta con ensayos de progenies de ésta (Mesén 2000). Como consecuencia es imprescindible disponer de métodos alternativos de propagación que contribuyan con su mejoramiento, conservación y el aumento de sus poblaciones.

Las técnicas de cultivo de tejidos ofrecen la posibilidad de multiplicar masivamente aquellos genotipos valiosos que pueden ser utilizados tanto para el establecimiento de plantaciones clonales como para la recuperación de zonas que otrora fueron bosque y cuyo uso fue sustituido por la ganadería (Hine-Gómez y Valverde-Cerdas 2003). Algunas especies del género *Dalbergia* han respondido a la propagación *in vitro* ya sea por medio de embriogénesis somática u organogénesis, tal ha sido el

caso de *Dalbergia sisso*, *Dalbergia latifolia*, *Dalbergia lanceolaria* y *Dalbergia paniculata* (Dwari and Chand 1996, Das *et al.* 1997, Pradhan *et al.* 1998, Sreedevi *et al.* 1999). El objetivo de este trabajo es establecer una metodología de propagación *in vitro* de cocobolo que permita mejorar su producción, rescate y conservación y que sirva de base para estudios futuros en biotecnología forestal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inducción de brotes adventicios: semillas maduras frescas de árboles seleccionados de cocobolo que fueron provistas por la Estación Experimental Los Horizontes, perteneciente al Área de Conservación Guanacaste, se escarificaron haciéndoles una incisión en su extremo superior. Posteriormente, fueron lavadas en una solución de agua y jabón por 5 minutos y desinfectadas con hipoclorito de sodio (5.5% i.a.) al 100% durante 20 minutos en continua agitación. En la cámara de flujo laminar se lavaron con agua estéril destilada hasta eliminar los residuos del desinfectante. Las semillas fueron inoculadas en un medio de agar y agua, y mantenidas en oscuridad bajo condiciones ambientales por un período de 15 días. El hipocotilo de las plántulas fue seccionado y colocado en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) suplementado con cinco diferentes concentraciones de benciladenina (4.4, 8.8, 13.3, 17.8, 22.2 μM), 30 g.l^{-1} de sacarosa y 7 g.l^{-1} de agar. Se utilizó un diseño irrestricto al azar de 48 explantes por tratamiento y la unidad experimental consistió de un frasco de cultivo conteniendo cuatro explantes.

Todos los medios se ajustaron a un pH de 5.7 con KOH 1N y esterilizados a 121°C y 15 lb de presión.

Enraizamiento de los brotes: cuando los brotes alcanzaron una longitud de 3 a 5 cm, fueron separados del explante y distribuidos en un diseño irrestricto al azar de 25 repeticiones por tratamiento en tubos de ensayo de 150 mm x 20 mm que contenían un medio de cultivo MS(1962) con cinco concentraciones de ácido

indolbutírico (IBA): 4.9, 9.8, 14.8, 19.7 y 24.6 μM y 20 g.l^{-1} de sacarosa. La unidad experimental consistió de un tubo de ensayo por brote.

Las variables evaluadas fueron: número de explantes con brotes, el número de brotes, el promedio de brotes por explante y el número de brotes desarrollados. El número de plantas enraizadas, el número promedio de raíces por planta y el aspecto de las raíces. Para el análisis de los datos se utilizó análisis de varianza y análisis de regresión empleándose para ello el programa estadístico SAS.

Después de 25 días en cultivo, las plantas fueron transferidas a bolsas de polietileno conteniendo tierra como sustrato y colocadas bajo condiciones de invernadero.

RESULTADOS

Germinación: La semilla de cocobolo utilizada en este estudio mostró un alto porcentaje de oxidación ya que el 37.5% de ellas se oxidó. Solo un 53% de las semillas germinaron y un 9.5% presentó contaminación ya fuese por hongo o por bacteria. El período de germinación no fue uniforme ya que éste se inició tres días después de su cultivo en el medio con agar y agua y la germinación continuó hasta por un período de 22 días.

Inducción de brotes adventicios: Los segmentos de hipocotilo que se utilizaron como explantes se tornaron verdes a los tres días de cultivo, la formación de callo se inició a los cuatro días y ya a los 9 días de cultivo fue notoria la proliferación de brotes adventicios en todos los tratamientos. Aunque se observó una gran abundancia de callo, los brotes se derivaron del tejido del explante y no del callo.

En todas las concentraciones se presenciaron la formación de brotes adventicios (Fig. 1) pero no todos los explantes respondieron a la formación de éstos. Algunos explantes presentaron una gran oxidación en sus extremos y abundante formación de callo.

El mayor porcentaje de explantes con brotes adventicios se presentó en la concentración



Fig. 1. Brotes adventicios de *Dalbergia retusa* inducidos en un medio de cultivo MS(1962) suplementado con 8.8 μM de BA.

Fig. 1. *Dalbergia retusa* adventitious buds induced on MS(1962) medium supplemented with 8.8 μM de BA.

de 4.4 μM con un 92.9% y el menor porcentaje de explantes con brotes fue de un 60.4% en la concentración de 22.2 μM ; encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Parece que al aumentar la concentración de BA el porcentaje de explantes con brotes tiende a disminuir y el valor de 70.4% observado en la concentración de 8.8 μM se debió a una mayor cantidad de explantes oxidados.

Se observó una tendencia a disminuir el número de brotes con aumentos en las concentraciones de la benciladenina, no obstante el

análisis de los datos no reveló diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$). El valor más alto (78 brotes) se observó a una concentración de 4.4 μM y el menor valor (50 brotes) a una concentración de 22.2 μM . El promedio de brotes por explante fue muy similar en todas las concentraciones y tampoco se halló diferencia significativa entre los tratamientos ($p > 0.05$). En todos los tratamientos, se presentó alargamiento de los brotes y a pesar de que no se observó diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) para esta variable, si fue notorio que a una concentración de 8.8 μM de BA a los 22 días de cultivo el 88% de los brotes tenían sus hojas expandidas (Cuadro 1). Fue común observar diferencias en el desarrollo de los brotes. Algunos brotes crecieron más rápidamente hasta alcanzar una longitud de 5.0 cm en un período de 32 días, mientras que otros apenas lograban una altura de 1 ó 2 cm. La inducción de brotes se hace ligeramente más lenta a concentraciones altas de BA. La forma de desarrollo de los brotes fue otra peculiaridad ya que algunos brotes presentaron entrenudos largos y una adecuada expansión de hojas o bien entrenudos cortos y hojas expandidas; y por el contrario otros mostraron entrenudos largos y ninguna expansión de hojas.

La separación del brote del explante sin un desarrollo apropiado del mismo, conlleva a un lento desarrollo y en algunos casos a su necrosamiento. Por esta razón, se separaron para su enraizamiento aquellos brotes con una longitud superior a 2.5 cm.

CUADRO 1

Formación de brotes adventicios en explantes de hipocotilo de *Dalbergia retusa*

TABLE 1
Adventitious bud induction in hypocotyl explants of *Dalbergia retusa*

Concentración BA (μM)	Porcentaje explantes con brotes	Número total de brotes	Promedio brotes por explante	Porcentaje brotes alargados (>2.5cm)
4.4	92.9	78	2.0	70
8.8	70.4	70	2.0	88
13.3	82.5	66	1.8	77
17.8	68.8	56	2.0	86
22.2	60.4*	56	1.8	71

Datos de 48 observaciones por tratamiento.

Enraizamiento de los brotes. A los ocho días de cultivo, se pudo observar la formación de callo en la base de los explantes y de raíces en algunos brotes en todas las concentraciones de AIB. Los tratamientos con concentraciones mayores de AIB mostraron desde un inicio una mayor cantidad de plantas enraizadas. En estos tratamientos a los 18 días de cultivo ya las raíces estaban bien formadas y largas (Fig. 2). En el Cuadro 2 se presenta el porcentaje de enraizamiento de los brotes y el promedio de raíces por planta en cada tratamiento. El mayor porcentaje de plantas enraizadas (91%) se presentó con una concentración de 19.7 μM de IBA y el menor porcentaje de enraizamiento, fue de un 63.6% en la concentración de 4.9 μM . El análisis estadístico no mostró diferencia significativa entre los tratamientos ($p > 0.05$). Por el contrario, si se halló diferencia significativa entre las distintas concentraciones de AIB para el número promedio de raíces por planta. El número promedio de raíces por planta incrementó conforme incrementó la concentración de AIB. A mayor concentración de la auxina, la raíz tiende a ser más gruesa. Las plantas enraizadas fueron aclimatadas en el invernadero.



Fig. 2. Brotes desarrollados y enraizados en un medio de cultivo MS a la mitad de su concentración y suplementado con 14.8, 19.6 y 24.6 μM de AIB (de izquierda a derecha).

Fig. 2. Developed and rooted buds on half-strength(1962) MS medium and supplemented with 14.8, 19.6 y 24.6 μM of AIB (from left to right).

CUADRO 2
Enraizamiento de los brotes adventicios de Dalbergia retusa en diferentes concentraciones de AIB

TABLE 2
Rooting of adventitious buds of Dalbergia retusa exposed to different concentrations of IBA

Concentración IBA (μM)	Porcentaje brotes enraizados	Número promedio raíces por planta
4.9	63.6	1.8*
9.8	72.7	2.6
14.8	77.2	3.0
19.7	91.0	3.1
24.6	77.0	3.4

Datos de 25 observaciones por tratamiento.

* Diferencias significativas al 0.05%.

DISCUSIÓN

La presencia de sustancias fenólicas en las semillas de cocobolo afectó el porcentaje de germinación. Sin embargo, este efecto se pudo disminuir cuando se transfirieron a un medio fresco. El problema de oxidación también se hizo presente en algunos explantes, lo que conllevó a una mayor producción de masa callosa en éstos y posteriormente su inmediato necrosamiento. El porcentaje de oxidación de los explantes fue de un 2%. A pesar de que algunos autores mencionan que la exudación de sustancias fenólicas es mayormente problemático en tejidos maduros que en juveniles (Bonga 1982, Gill y Gosal 1996), ésta no dejó de ser una limitante en la producción de estructuras organogénicas en explantes de hipocotilo de cocobolo.

Las citocininas son muy efectivas para promover la iniciación de brotes ya sea directa o indirectamente (George 1993). La adición de BA en el medio de cultivo fue fundamental para la formación de brotes adventicios en los segmentos de hipocotilo de *Dalbergia retusa*. La formación y el desarrollo de estos brotes fue muy uniforme en todas las concentraciones de BA evaluadas. No obstante, en las concentraciones de 17.8 y 22.2 μM el proceso de

inducción es más lento que en las concentraciones inferiores a éstas.

Una concentración baja de BA como 4.4 μM es adecuada para la regeneración de cocobolo por medio de organogénesis a partir de explantes de hipocotilo de plántulas germinadas *in vitro* pero esta metodología podría optimizarse más ya que el número promedio máximo de brotes por explante fue de dos brotes. La abundante formación de callo y la oxidación de algunos explantes pudo haber sido una de las causas de esta respuesta.

En cuanto a algunas particularidades observadas en el desarrollo de los brotes como la presencia de brotes con entrenudos largos o cortos con o sin desarrollo de hojas, no se puede generalizar que se deban a efecto del tratamiento por cuanto en todos los tratamientos pudo observarse aunque con mayor frecuencia en los tratamientos de 17.8 y 22.2 μM . Sin embargo, George (1993) menciona que concentraciones muy altas de citocininas, pueden causar la producción de una gran cantidad de brotes pequeños que generalmente no se alargan; o bien que las hojas, en algunas especies, presenten una forma inusual, e inducir brotes que lleguen a ser hiperhídricos. Efectivamente sí pudo observar el desarrollo de brotes que no lograron alcanzar una longitud deseada.

En algunos de los brotes que alcanzaron una longitud de 5 cm se formaron una o dos raíces en el medio de inducción. Sobre esto, George (1993) menciona que las especies que producen raíces *in vitro* con facilidad pueden pasar directamente a una etapa de endurecimiento en el invernadero. Sin embargo, en este caso para lograr un enraizamiento generalizado y uniforme en los tallos aéreos fue necesario adicionar AIB al medio de cultivo. Hubo una ligera tendencia lineal a aumentar el número promedio de raíces al incrementar la concentración de AIB, no así con el número de brotes enraizados. El mayor porcentaje de tallos aéreos enraizados se observó con la concentración de 19.7 μM de AIB y el mayor número promedio de raíces por planta se obtuvo con la

concentración de 24.6 μM . La razón de esta diferencia fue que a mayor concentración de AIB, se formó una mayor cantidad de callo en la base de los explantes. George (1993), menciona que con frecuencia el número de raíces aumenta proporcionalmente con la concentración de la auxina hasta que la concentración llega a ser más que óptima produciéndose una excesiva formación de callo y raíces malformadas.

Se presenta por primera vez en este artículo un protocolo de propagación *in vitro* en *Dalbergia retusa*.

RESUMEN

Se obtuvieron plantas vía Organogénesis a partir de explantes de hipocotilo de plántulas germinadas *in vitro* de Cocobolo (*Dalbergia retusa*). La inducción de los brotes adventicios se logró en un medio Murashige y Skoog (1962) que contenía cinco concentraciones de BA (benciladenina). La mejor concentración de BA para la inducción y desarrollo de los brotes fue 8,8 mM. El enraizamiento de los brotes se logró en un medio M&S (1962) a la mitad de su concentración, suplementado con 20 g/l de sacarosa y cinco concentraciones de IBA (ácido indolbutírico). El mayor número de brotes enraizados se obtuvo con 19,7 mM de IBA pero el mayor número promedio de raíces se obtuvo con 24,6 mM de IBA. Las plantas se transfirieron al invernadero para su aclimatación.

REFERENCIAS

- Bonga, J. 1982. Vegetative propagation of mature trees by tissue culture, pp. 191-196. In A.N. Rao (ed.). Tissue Culture of Economical Important Plants. Proceedings of the International Symposium, Costed and ANBS, Singapore.
- Anónimo. 1997. Plagas de semillas forestales en América Central y el Caribe. Manual técnico No.25. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. 113 p.
- Anónimo. 1998. *Dalbergia retusa* Hemsl. Nota Técnica sobre Manejo de Semillas Forestales No.34. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. 2 p.
- Carpio, I. 1992. Maderas de Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José. 338 p.

- Das P., S. Samantaray, A.V. Roberts & G.R. Rout. 1997. *In vitro* somatic embryogenesis of *Dalbergia sisso* Roxb.-a multipurpose timber-yielding tree. *Plant Cell Reports* 16: 578-582.
- Dwari M. & P.K. Chand. 1996. Evaluation of explants, growth regulators and culture passage for enhanced callus induction proliferation and plant regeneration in the tree legume *Dalbergia lanceolaria* L. *Phytomorphology* 46: 123-131.
- Geilfus F. 1989. El árbol al servicio del agricultor. Manual de Agroforestería para el desarrollo Rural 2. Guía de Especies. Enda-Caribe/CATIE. Editorial Santo Domingo. 778 p.
- George E.F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics, Edington. 1361 p.
- Gill, R. & S. Gosal. 1996. Micropropagation of economically important tropical trees, p.230-233. *In* M. Dieters, A. Matheson, D. Nikles & C. Hardwood (eds.). *Tree improvement for sustainable tropical forestry*. QFRI-IUFRO Conference. Caloundra, Queensland, Australia.
- Hine-Gómez, A. & L. Valverde-Cerdas. 2003. Establecimiento *in vitro* de *Cryptomeria japonica* (Taxodiaceae). *Rev. Biol. Trop.* 51: 683-690.
- Holdridge L.R., L.J. Poveda & Q. Jiménez. 1997. *Árboles de Costa Rica* Vo.1. Centro Científico Tropical. San José, Costa Rica.
- Jiménez Q. 1993. *Árboles maderables en peligro de extinción en Costa Rica*. INCAFO, San José. 121 p.
- Mesén F. 2000. Rescate, propagación, conservación y uso de especies y poblaciones forestales amenazadas en Costa Rica y Panamá, pp. 10-11. *In* MINAE/ITCR (eds). *Encuentro de Genética Forestal. Estado de la Investigación en Costa Rica*. San José, Costa Rica.
- Murashige T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Pradhan C., S. Kar, S. Pattnaik & P.K. Chand. 1998. Propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb through *in vitro* shoot proliferation from cotyledonary nodes. *Plant Cell Rep.* 18: 122-126.
- Rodríguez-Navas, H. 2001. *Plantas plaguicidas en Costa Rica*. Universidad Nacional, Costa Rica. 154 p.
- Sreedevi E., T. Pullaiah & P. Kishor. 1999. *In vitro* plantlet regeneration from seedling explants of *Dalbergia paniculata* Roxb, pp. 112-117. *In* *Plant tissue culture and biotechnology: emerging trends*. Proceedings of a symposium held at Hyderabad, Universities, Hyderabad, India.