

## ORGANOGENESIS EN *Crotalaria retusa* SE-61

**Maribel Quintana, Lisbet Ulloa, J.A. Nápoles, A. Moles y A. Carbonell**

**Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spíritus  
Sancti Spíritus, Cuba**

Con el objetivo de determinar el balance adecuado de reguladores de crecimiento para la multiplicación *in vitro* de *Crotalaria retusa* SE-61 se probaron combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (6-BAP) en medio basal de Murashige y Skoog (1962); se obtuvo una buena regeneración, con un coeficiente de multiplicación de 6,6 vitroplantas. Para el enraizamiento se probaron dosis de ácido indolacético (AIA) y ANA en medio sólido y líquido y hubo una rizogénesis eficiente en este último suplementado con 3 mg de AIA/L. Las plántulas obtenidas fueron fácilmente adaptables a condiciones ambientales al transferirlas a un sustrato de suelo y materia orgánica (7:3).

**Palabras clave: Cultivo de órganos, cultivo de tejidos, *Crotalaria retusa***

In order to determine the balance of suitable growth regulators in *Crotalaria retusa* SE-61 *in vitro* multiplication, combinations of naphthalene acetic acid (NAA) and 6-benzylaminopurine (6-BAP) were tested in Murashige and Skoog's basal medium (1962). Successful generations were obtained with a multiplication rate of 6,6 *in vitro*-plants. For rooting induction several levels of indole acetic acid (IAA) and NAA were tested in solid and liquid medium with an efficient rhizogenesis in the last one, which was supplemented with 3 mg of IAA/L. The seedlings obtained were easily adapted to the environmental conditions when transferred to the soil enriched with organic matter

**Additional index words: Organ culture, tissue culture, *Crotalaria retusa***

A muchos años atrás se remonta el uso de la biotecnología y de las múltiples posibilidades del cultivo de tejidos de las plantas superiores (Street, 1977) y no por ello es menos cierto que la propagación de plantas, tal vez uno de los métodos más simples, es el que mayor aplicabilidad ha tenido (Holdgate, 1977).

Aunque frecuentemente el cultivo de plantas necesarias para el hombre se garantiza por la vía convencional, estos métodos en los que en muchos casos la multiplicación es miles de veces superior, contribuyen a la introducción de nuevas variedades y a la reproducción de plantas de propagación sexual o vegetativa (Rao, 1977).

En las prospecciones realizadas por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spíritus una de las leguminosas que más se han destacado por su comportamiento agronómico es *Crotalaria retusa* SE-61. Esta planta ha presentado dificultades para su multiplicación debido al ataque de plagas, por lo que se han empleado diferentes vías con el fin de tratar de mejorar este proceso. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue definir la combinación adecuada de reguladores de crecimiento para la propagación de esta especie por métodos biotecnológicos.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Procedimientos generales**

Como fuente de material vegetal se usaron plántulas de la accesión *C. retusa* SE-61, obtenidas de semillas germinadas *in vitro*, las cuales fueron suministradas por el banco de introducción de leguminosas prospectadas de la Estación.

Las semillas fueron desinfectadas con agua y detergente, etanol (70 %) y una gota de Tween-20 durante 30 segundos, seguido de bicloruro de mercurio (0,1 %) en agitación continua por 20 minutos, y se enjuagaron con agua destilada estéril cinco veces.

El medio basal para todos los experimentos fue el descrito por Murashige y Skoog (1962). Para la gelificación de este se usó agar (0,8 %) y en todos los casos el pH se ajustó a 5,8 antes del autoclaveado. Se emplearon tubos de ensayo (15,5 x 2,0 cm) a los que se les añadió 10 mL de medio de cultivo. La fuente de iluminación empleada fue la luz natural y la temperatura fue de  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Para el procesamiento estadístico de los datos se empleó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y las diferencias se definieron a través del test de Mann Whitney. Todo el proceso se realizó con el paquete SPSS/PC para Windows versión 5.0. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y 30 réplicas por tratamiento.

### **Inducción de regeneración *in vitro***

Como explantes se usaron yemas apicales y axilares de las plántulas a los 30-35 días posteriores a la siembra. Los explantes tenían un tamaño aproximado de 1 cm y se eliminó la hoja en todos los casos; las yemas apicales se cortaron independientes del último nodo, excepto en los casos en que fue imposible la separación.

Los reguladores de crecimiento probados fueron el ácido naftalenacético solo (ANA) en dosis de 0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 mg/L y combinado con 0,5 mg/L de 6-bencil-aminopurina (6-BAP).

Las variables medidas fueron: regeneración (%), enraizamiento (%), formación de callos (%) y cantidad de yemas por planta a los 15 y 30 días de sembradas.

### **Efecto de otras dosis de 6-BAP en la regeneración**

Tomando como referencia los resultados del experimento anterior se probaron niveles de 0,5; 1,0 y 2,0 mg de 6-BAP/L y 0 y 0,1 mg de ANA/L, con el objetivo de evaluar el comportamiento de la especie en el subcultivo del callo al emplear dosis superiores de la citoquinina.

Las variables medidas fueron: explantes que regeneran vástagos (%) y explantes que forman callos (%) a los 15 y 30 días posteriores a la siembra y la cantidad de yemas por planta a los 30 días.

### **Inducción de enraizamiento en medio sólido**

Los explantes empleados fueron vástagos procedentes de la multiplicación, de aproximadamente 1,5-2,0 cm de largo, y se estudió el efecto de las dosis de 1, 2 y 3 mg de ANA y ácido indolacético (AIA)/L, combinadas con 6-BAP (0,5 mg/L) mediante el mismo procedimiento ya descrito. Se evaluaron los siguientes indicadores: explantes que regeneran (%), explantes que enraizan (%), explantes que forman callos (%), cantidad de brotes y yemas por planta y total de plantas obtenidas a los 15 y 30 días.

### **Inducción de enraizamiento en medio líquido**

Se probaron como auxinas el AIA y el ANA en concentraciones de 3 mg/L en un medio líquido con soporte de papel de filtro. El explante se colocó sobre el soporte y quedó inmersa en el medio líquido una tercera parte por su extremo terminal.

Se evaluó la regeneración (%), el enraizamiento (%), la formación de callos (%) y la cantidad de yemas por planta a los 15 y 30 días.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Inducción de regeneración *in vitro*

En los resultados que se muestran en la tabla 1 puede observarse un elevado potencial de regeneración en esta especie, al ser capaz de emitir vástagos directamente de los callos formados aun sin la presencia de ningún regulador de crecimiento, comportamiento no usual para las leguminosas que generalmente se informan como "recalcitrantes" en la regeneración (Hammatt, Ghose y Davey, 1986; Nagl, Ignacimuthu y Becker, 1997). No obstante, existen también algunas como *Medicago sativa* que se considera el modelo para la semilla artificial (Saunders y Bingham, 1972) y el *Stylosanthes guianensis* constituye un patrón para la organogénesis indirecta (Mesa, Lajonchere, Prieto y Toral, 1993).

Se observó la formación de callo nodular en todos los tratamientos y existió una alta capacidad para la rediferenciación celular, sobre todo en presencia de la citoquinina y con dosis bajas de auxina, ya que se obtuvo como promedio 4,5 vástagos adventicios en el callo (fig. 1) con niveles de 0,5 mg de 6-BAP/L y 0,1 mg de ANA/L.

La formación de raíces no fue eficiente, lo cual era de esperar como comportamiento típico de la organogénesis, ya que las proporciones de auxina-citoquinina determinan la respuesta morfogénica *in vitro* (Litz y Jarret, 1991); por ello para los niveles más altos de ANA se verificó una tendencia al aumento del enraizamiento. Este comportamiento, informado también por McKently, Moore y Gardner (1989), resultó favorable en esta etapa de la investigación.

Tabla 1. Comportamiento de *C. retusa* SE-61 ante la regeneración.

Tratamientos (mg/L)			% de explantes que regeneran vástagos		% de explantes que enraizan		% de explantes que forman callos		Cantidad de yemas por explante	
No.	ANA	6-BAP	15 días	30 días	15 días	30 días	15 días	30 días	15 días	30 días
1	0	0	100 <sup>a</sup>	100	8,3	8,3	0 <sup>c</sup>	100	1,5	1,8 <sup>bc</sup>
2	0,1	0	91,7 <sup>ab</sup>	100	8,3	8,3	0 <sup>c</sup>	100	1,8	2,4 <sup>bc</sup>
3	0,5	0	91,7 <sup>ab</sup>	91,7	8,3	8,3	33,3 <sup>ab</sup>	100	1,3	1,9 <sup>bc</sup>
4	1,0	0	58,3 <sup>b</sup>	100	0	8,3	0 <sup>c</sup>	100	0,7	1,9 <sup>bc</sup>
5	2,0	0	83,3 <sup>ab</sup>	100	8,3	36,4	50,0 <sup>a</sup>	100	1,2	2,4 <sup>bc</sup>
6	0,1	0,5	100 <sup>a</sup>	100	0	8,3	33,3 <sup>ab</sup>	100	1,8	4,5 <sup>a</sup>
7	0,5	0,5	91,7 <sup>ab</sup>	100	0	0	8,3 <sup>bc</sup>	100	1,8	2,5 <sup>b</sup>
8	1,0	0,5	100 <sup>a</sup>	100	0	0	8,3 <sup>bc</sup>	100	1,9	1,4 <sup>c</sup>
9	2,0	0,5	91,7 <sup>ab</sup>	100	0	16,7	16,7 <sup>ab</sup>	100	2,1	2,3 <sup>bc</sup>

a,b,c Valores con superíndices no comunes difieren significativamente

### Efecto de otras dosis de 6-BAP en la regeneración

En la tabla 2 puede observarse que no hubo diferencias significativas en cuanto a la regeneración de vástagos al aumentar los niveles de citoquinina, aunque solo se obtuvo el 100 % de regeneración con la dosis más alta (2,0 mg/L) que llegó a formar 3,8 yemas por callo subcultivado; este potencial de multiplicación es superior a los obtenidos por Nápoles (1995) y Quintana (1995).

El crecimiento del callo en este subcultivo estuvo inhibido, lo cual puede ser atribuido al aumento en los niveles de 6-BAP (Narciso, Hattori y Wada, 1996), aunque no se contraponen a la regeneración, pues la elongación de los vástagos permite elevar el número de yemas por planta.

Otro efecto tangible del 6-BAP fue la anulación del enraizamiento, ya que no se observó en ningún caso la emisión de raíz debido a la baja presencia auxínica; estos resultados coinciden con los de Ladeinde (1986) y Quintana (1995).

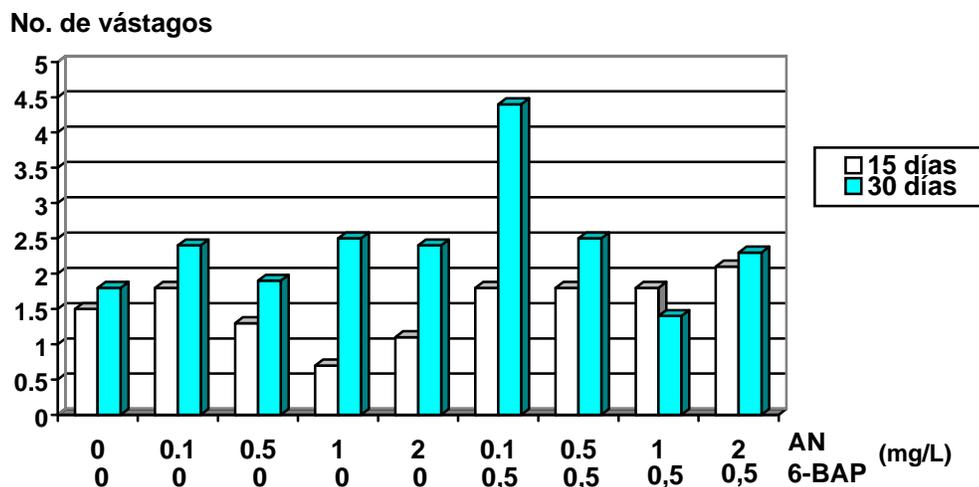


Fig. 1. Cantidad de vástagos obtenidos por tratamiento.

### Inducción de enraizamiento en medio sólido

En el medio sólido (tabla 3), contrariamente a lo esperado, al incrementar los niveles auxínicos no se observó respuesta en el enraizamiento, excepto con 2 mg de ANA/L (21 %); mientras que en el medio libre de reguladores de crecimiento se obtuvo una mejor respuesta (68,4 %). Este comportamiento parece deberse al efecto residual de la acumulación endógena necesaria para diferenciar nuevos órganos y tejidos. Es por ello que en la literatura se recomienda la transferencia del cultivo, una vez establecido, a medios desprovistos de reguladores de crecimiento, lo que es suficiente para estimular la diferenciación (Tisserat, 1985) y fue corroborado en *Vigna* por Gill, Eapen y Rao (1986) y Patel, Bhardwaj y Joshi (1991).

Tabla 2. Respuesta de *C. retusa* SE-61 ante el estímulo de la regeneración con diferentes dosis de 6-BAP combinado con ANA.

Tratamientos (mg/L)			% de explantes que regeneran vástagos		% de crecimiento del callo		Cantidad de yemas por planta
No.	ANA	6-BAP	15 días	30 días	15 días	30 días	30 días
1	0	0	100	84,0	52,2	54,5 <sup>ab</sup>	2,7
2	0	0,5	83,3	83,3	20,8	20,8 <sup>bc</sup>	3,6
3	0	1,0	88,0	88,0	56,0	56,0 <sup>a</sup>	2,0
4	0	2,0	80,0	75,0	36,0	36,0 <sup>ab</sup>	1,9
5	0,1	0,5	83,3	80,9	41,7	41,7 <sup>ab</sup>	2,9
6	0,1	1,0	94,4	73,3	27,8	33,3 <sup>c</sup>	2,3
7	0,1	2,0	100	100	33,3	38,1 <sup>bc</sup>	3,8

a,b,c Valores con superíndices no comunes difieren significativamente

Es de destacar que este efecto fue muy favorable además en la regeneración de plantas, ya que el coeficiente de multiplicación alcanzó niveles de 6,6 vitroplantas, tanto por efecto de la elongación del vástago como por la estimulación del ahijamiento en su base (brotes); este coeficiente es bastante elevado

en comparación con el de otras leguminosas y presentó diferencias altamente significativas con relación al resto de los tratamientos.

### Inducción de enraizamiento en medio líquido

Los resultados expuestos en la tabla 4 evidencian la efectividad del medio líquido en el enraizamiento, pues se alcanzó un 90,9 % al emplear 3 mg de AIA/L con diferencias altamente significativas. También mostraron un comportamiento favorable la emisión de vástagos, la inhibición de callos (indeseable en esta etapa) y el coeficiente de multiplicación (4,9). En otras leguminosas el AIA ha resultado efectivo para el enraizamiento, de acuerdo con lo informado por Narasimhan, Rao y Rao (1986) y Gulati y Jaiwal (1990).

Es contrastante el hecho de que el ANA inhibiera completamente el enraizamiento, lo cual puede atribuirse a que el efecto de esta hormona es mucho más fuerte que el del AIA (Pierik, 1990); tanto es así que promovió un 100 % de callogénesis desde los primeros 15 días de la inoculación al medio.

Finalmente las plántulas obtenidas se transfirieron a bandejas de polieturano con un sustrato 7:3 de suelo y materia orgánica, respectivamente. La adaptación al ambiente fue exitosa.

Se concluye que el medio MS con 0,5 mg de 6-BAP/L y 0,1 mg de ANA/L produjo 4,5 vástagos por explante; además, en esta especie el 6-BAP presentó tendencia a inhibir la regeneración de raíces en ausencia de ANA o cuando este se empleó en bajas concentraciones. El medio sólido, libre de reguladores de crecimiento, favoreció marcadamente la regeneración, elevándose el coeficiente de multiplicación a 6,6 vitroplantas; el empleo de 3 mg de AIA/L en medio líquido resultó favorable en la fase de enraizamiento de las vitroplantas, por lo que fue efectiva la organogénesis vía callo para la acesión *C. retusa* SE-61.

### REFERENCIAS

- GILL, R.; EAPEN, SUSAN & RAO, P. 1986. Morphogenetic studies in *Vigna aconitifolia* Jacq. Marichal and *Vigna mungo* L. Hepper. 6<sup>th</sup> Int. Cong. Plant Tissue Cell Cult. p. 28
- GULATI, A. & JAIWAL, P.K. 1990. Culture conditions affecting plant regeneration from cotyledons of *Vigna radiata* L. Wilczek. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 23(1):1
- HAMMATT, N.; GHOSE, T.K. & DAVEY, M.R. 1986. Regeneration in legumes. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. (Ed. I.K. Vasil). Academic Press, New York. Vol. 3, p. 83
- HOLDGATE, D. 1977. Propagation of ornamentals by tissue culture. In: Plant cell, tissue and organ culture. (Eds. J. Reinert and Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag, Berlin. p. 78
- LADEINDE, T. 1986. Progress on organ tissue culture studies of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. 6<sup>th</sup> Int. Cong. Plant Tissue Cell Cult. p. 233
- LITZ, R.E. & JARRET, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. (Eds. W.M. Roca y L.A. Mroginski). CIAT. Cali, Colombia. p. 143
- McKENTLY, A.H.; MOORE, G.A. & GARDNER, F.P. 1989. *In vitro* plant regeneration of Peanut from seed explants. **Crop Sci**. 30:192
- MESA, A.R.; LAJONCHERE, G.; PRIETO, MARLENIS & TORAL, ODALYS. 1993. Organogénesis en *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184. **Pastos y Forrajes**. 16:207
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plantarum**. 15:473
- NAGL, W.; IGNACIMUTHU, S. & BECKER, J. 1997. Genetic engineering and regeneration of *Phaseolus* and *Vigna*. State of the art and new attempts. **J. Plant Physiol**. 150:625
- NAPOLES, J.A. 1995. Aplicaciones del cultivo de tejidos en el rescate de *Macroptilium atropurpureum* SE-72, naturalizado en áreas ganaderas de la provincia de Sancti Spiritus. Trabajo de Diploma. Sede Universitaria Sancti Spiritus. UCLV. Villa Clara, Cuba. p. 16

Tabla 3. Comportamiento de *C. retusa* SE-61 ante diferentes dosis de auxinas combinadas con 6-BAP.

Tratamientos (mg/L)				% de explantes que regeneran		% de explantes que enraízan		% de explantes que forman callos		Cantidad de brotes/planta		Cantidad de yemas/planta		Total de plantas obtenidas	
No.	ANA	AIA	6-BAP	15 días	30 días	15 días	30 días	15 días	30 días	15 días	30 días	15 días	30 días	15 días	30 días
1	0	0	0	100 <sup>a</sup>	100	50 <sup>a</sup>	68,4 <sup>a</sup>	30 <sup>b</sup>	68,4	1,9 <sup>a</sup>	2,3 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	4,3 <sup>a</sup>	4,1 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>
2	1	0	0,5	95 <sup>a</sup>	100	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>	100	1,0 <sup>b</sup>	1,0 <sup>b</sup>	0,1 <sup>c</sup>	0,1 <sup>c</sup>	1,1 <sup>c</sup>	1,2 <sup>c</sup>
3	2	0	0,5	95 <sup>a</sup>	100	0 <sup>b</sup>	21,0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100	1,1 <sup>b</sup>	0,9 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0,7 <sup>b</sup>	1,1 <sup>c</sup>	1,7 <sup>c</sup>
4	3	0	0,5	80 <sup>b</sup>	100	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>	100	0,9 <sup>b</sup>	0,9 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0,1 <sup>c</sup>	0,9 <sup>c</sup>	0,9 <sup>c</sup>
5	0	1	0,5	100 <sup>a</sup>	100	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>	100	2,1 <sup>a</sup>	2,4 <sup>a</sup>	1,2 <sup>b</sup>	1,4 <sup>bc</sup>	3,3 <sup>ab</sup>	3,7 <sup>b</sup>
6	0	2	0,5	100 <sup>a</sup>	90	0 <sup>b</sup>	15,0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	90	2,3 <sup>a</sup>	2,1 <sup>a</sup>	0,4 <sup>c</sup>	1,8 <sup>b</sup>	2,7 <sup>b</sup>	4,1 <sup>b</sup>
7	0	3	0,5	100 <sup>a</sup>	100	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>	95	1,7 <sup>a</sup>	1,4 <sup>b</sup>	0,1 <sup>c</sup>	0,3 <sup>c</sup>	1,7 <sup>c</sup>	1,8 <sup>c</sup>

a,b,c Valores con superíndices no comunes difieren significativamente

Tabla 4. Respuesta ante la inducción con ANA y AIA en medio líquido.

Tratamientos (mg/L)			% de explantes que regeneran vástagos		% de explantes que enraízan		% de explantes que forman callos		Cantidad de yemas/planta	
No.	AIA	ANA	15 días	30 días	15 días	30 días	15 días	30 días	15 días	30 días
1	0	0	100	100	9,1 <sup>b</sup>	9,1 <sup>b</sup>	45,4 <sup>b</sup>	45,4 <sup>b</sup>	1,91	2,0
2	3	0	100	100	72,7 <sup>a</sup>	90,9 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	3,63	4,9
3	0	3	100	100	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	2,20	2,9

a,b,c Valores con superíndices no comunes difieren significativamente

- NARASIMHAM, M.; RAO, I.U. & RAO, I.V. 1986. A method for improvement and rapid propagation of recalcitrant legumes. 6<sup>th</sup> Int. Congr. Plant Tissue Cell Cult. p. 25
- NARCISO, JOSEFINA; HATTORI, K. & WADA, T. 1996. Histological observation of callus formation in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) cotyledon culture. **Japanese J. of Crop Science**. 65(4):663
- PATEL, M.; BHARDWAJ, R. & JOSHI, A. 1991. Organogenesis in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Indian J. Exp. Biol.** 29:619
- PIERIK, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid, España. p. 91
- QUINTANA, MARIBEL. 1995. Cultivo *in vitro* de *Vigna luteola* SC-123. Tesis en opción al grado de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. UCLV. Villa Clara, Cuba. 48 p.
- RAO, A. 1977. Tissue culture in the orchid industry. In: Plant cell, tissue and organ culture. (Eds. J. Reinert and Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag, Berlin. p. 45
- SAUNDERS, J.W. & BINGHAM, E.T. 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. **Crop Sci.** 12:804
- STREET, H. 1977. Old problems and new perspectives. In: Plant tissue and cell culture. (Ed. H.E. Street). University of California Press, USA. p. 501
- TISSERAT, B. 1985. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: Plant cell culture: a practical approach. (Ed. R. Dixon). Department of Biochemistry, Royal Holloway College, UK. p. 90

**Recibido el 15 de diciembre de 1998**  
**Acceptado el 20 de abril de 1999**