

OBTENCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE COTILEDONES ETIOLADOS DE *Pinus elliotii*.

Teresa Argüelles y Andrés *
Ricardo Eugenio Callaba **

RESUMEN

Bajo la influencia de manipulaciones severas, cuyo objeto fue la desinfección del material vegetal, y de una mínima cantidad de moléculas carbonadas como fuente de energía en el medio de cultivo, se han obtenido callos friables, a partir de cotiledones etiolados de tres días de edad, de *Pinus elliotii*. Aparentemente se habrían obtenido yemas caulinares, que murieron al ser desinfectado el tejido.

No se sabe si las yemas degeneraron a tejido calloso, o si el callo fue inducido a partir de tejido cotiledonar sin diferenciar, debido a las drásticas condiciones a las que fueron sometidos los cotiledones.

SUMMARY

Callus tissue was obtained from *Pinus elliotii* ethiolated cotyledons, excised from a 3 days old embryo, under the influence of severe conditions created to prevent fungi contamination and a minimum amount of a carbon source molecule in the culture media. The origin of the callus tissue was uncertain. It could have been formed from caulinar buds differentiated on the cotyledon, or from the cotyledonar tissue itself, induced by the dreadful conditions needed to maintain aseptic conditions in the culture environment.

* Lic. en Ciencias, M. Sc., Prof. regular Adjunto "a cargo" de la Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Forestales. UNaM. Eldorado.

** Técnico Agrónomo. Ayudante de Cátedra, Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Forestales. UNaM. Eldorado

INTRODUCCIÓN

La madera y sus productos proporcionan todos los años, recursos y empleo a millones de personas. Por ejemplo, durante el año 1986, el comercio de los productos forestales excedió los 100 billones de dólares (6).

Con el creciente aumento de población y el mejoramiento de la calidad de vida de los habitantes del planeta, es de esperar que las necesidades de madera y sus derivados irán en aumento.

En la actualidad, todo el mundo es consciente que los montes y selvas naturales se están extinguiendo, por lo que resulta necesario realizar un esfuerzo en términos de tiempo y dinero, de la misma forma que se ha hecho con los árboles frutales, con los que numerosos trabajos de selección, hibridación y propagación, han llevado a los excelentes niveles de producción que ahora se conocen.

Una eficiente planificación forestal debe incluir árboles de madera de buena calidad, de crecimiento rápido, troncos rectos y uniformes, ciclos cortos, alto rendimiento del tronco en relación a la biomasa total, resistencia a enfermedades y plagas, etc...

En el terreno ecológico, se busca conseguir árboles que puedan adaptarse a distintas condiciones climáticas, a suelos de composición variada, y que fijen la mayor cantidad posible de CO₂ por unidad de tiempo.

El mejoramiento genético convencional debe sortear grandes obstáculos; los largos periodos de juvenilidad es uno de los más graves, ya que desde la germinación a la floración pueden pasar de 15 a 20 años. Además muchos de los conocimientos acumulados por anteriores investigadores se han perdido, debido a la falta de continuidad en programas de muy larga duración. Queda por tanto el cultivo de tejidos como una técnica para conseguir

las características deseadas en un futuro próximo.

En 1934 Gautheret , comenzó la historia del cultivo "in vitro" de especies forestales, cultivando tejido del cambium de *Pinus pinaster* y *Abies alba* . En 1940 obtuvo yemas adventicias a partir de callos de *Ulmus campestris* (7). En 1950, Ball (2), consiguió inducir yemas a partir de callos de *Sequoia sempervivens* .

La primera planta forestal regenerada "in vitro" se obtuvo en 1970 con Winton y col. los cuales partieron de un cultivo de callos de *Populus tremuloides* (10). En 1974, Brown consigue la primera plántula "in vitro" de la gimnosperma *Pinus palustris* (4).

Desde que se obtuvo la primera plántula regenerada "in vitro" de una conífera, se han realizado grandes progresos, sin embargo la propagación de las coníferas mediante el cultivo "in vitro" se presenta como un área nueva y en desarrollo donde diariamente se realizan progresos.

La manipulación genética celular necesita como tecnología adicional la propagación "in vitro". Es por ello por lo que, aunque la propagación agámica de las coníferas, según se hace actualmente, no aparezca como una ventaja comercial cierta, es una promesa para el futuro, cuando de células manipuladas genéticamente deban ser regeneradas plantas enteras. El conocimiento adquirido hoy, servirá para obtener mejores variedades en el futuro.

MATERIALES Y MÉTODO

Se utilizaron semillas de *Pinus elliottii* de procedencia comercial, de árboles de polinización abierta, ubicados en la zona del Alto Paraná misionero. La semilla fue almacenada entre 6 -8° C en heladera hasta su utilización.

Para su desinfección, las semillas fueron escarificadas durante 5 minutos con ácido sulfúrico concentrado comercial (30% v/v), se enjuagaron y mantuvieron en agua durante aproximadamente una hora, eliminando todas las que después de ese lapso flotaban en la superficie. Las restantes, fueron sometidas a un flujo suave de agua corriente durante 48 horas para asegurar que fueran embebidas en agua(1).

A continuación se esterilizaron durante media hora con lavandina comercial al 60%, adicionada con 2 gotas de Tween 20. Eliminados los restos de lavandina con 3 enjuagues de agua estéril de 5

minutos de duración cada uno, las semillas se siguieron desinfectando con peróxido de hidrógeno al 10% durante 10 minutos y se lavaron nuevamente con 3 enjuagues de agua estéril de 5 minutos cada uno.

Seguidamente se estratificaron en heladera entre 4 - 6°C, durante 72 horas(2).

Terminada la estratificación, las semillas se partieron con un pelacables desinfectado al fuego, y debido a que se trabajó en un medio ambiente no estéril, sobre mesada de laboratorio, al extraer el megagametofito, se volvió a desinfectar durante 15 minutos con lavandina comercial al 20%, enjuagado con agua estéril, desinfectado de nuevo con peróxido de hidrógeno al 10% durante 5 minutos, y vuelto a enjuagar con agua estéril.

Los embriones fueron separados y puestos a germinar en placas de petri en un medio con sacarosa al 1% , solidificado con agar (0.7% p/v). Fueron ubicados horizontalmente sobre el agar, seleccionando los no dañados y de apariencia firme. Se mantuvieron en la oscuridad a $27 \pm 5^\circ\text{C}$.

Después de tres días, se aislaron los cotiledones de los embriones germinados, y fueron utilizados como explanto inicial para la obtención de yemas. En otras experiencias los embriones completos fueron utilizados como explanto inicial.

El medio basal que se empleó para todos los explantos fue la formulación de sales inorgánicas de Murashige y Skoog x 1/2 (8) adicionada con inositol 100 mg/l ; asparragina 100 mg/l; ácido nicotínico 5 mg/l; tiamina hidroclicórica 5 mg/l; piridoxina hidroclicórica 0.5 mg/l; bencil adenina 10-5 M ; agar Berna 11 gr/l; el pH de medio fue ajustado a 5.7 - 5.8 antes de autoclavar a 121°C durante 20 minutos(5). Para inducir la formación de yemas en los cotiledones y en los callos formados a partir de estos, se ensayaron otros medios, sin hormonas, y con la formulación de M y S x 1/4.

Debido a que se trabajaba en ambiente ordinario, no estéril, y en un clima húmedo como el clima de Misiones, se trató de minimizar la infección por esporas, adicionando solamente 1% de sacarosa como fuente carbonada al medio de cultivo de los explantos, cuando observamos que estos morían.

Los cotiledones separados, o los embriones utilizados como explantos, después del periodo original de 3 días en la oscuridad, se mantuvieron a $27 \pm 5^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas de luz de 1000 luxes de intensidad.

Para todas las manipulaciones, se trabajó

debajo de una campana formada por el cuerpo de un desecador invertido, levantado sobre la mesada con tacos de madera. Todo el conjunto se esterilizaba para cada sesión de trabajo.

En cuanto se detectaba un cultivo infectado, se tomaba el cotiledón y bajo la "campana" se desinfectaba con alcohol isopropílico al 78% durante 1 minuto, enjuagado con agua destilada estéril aplicada a presión y vuelto a poner en medio nuevo. En otros casos, se adicionó Benomil en polvo sobre el medio y el cotiledón contaminado.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El crecimiento de las hifas de los hongos, sobre medio adecuado es tan rápido en Misiones, que en un fin de semana se puede echar a perder todo el trabajo de la semana precedente. Hay sobre todo un hongo de hifas blancas y algodonosas (*Fusarium* spp. (9)), cuyas esporas e hifas son increíblemente resistentes a la desinfección por agentes químicos.

Nosotros no detectamos la presencia de yemas. El cotiledón tomaba, en los primeros días del cultivo un aspecto hinchado y se curvaba, de forma que sus extremos se tocaban. Después, quizás por la influencia del desinfectante, tomaba un aspecto irregular, donde parecían querer diferenciarse yemas caulinares. Sin embargo, la desinfección reiterada del explanto y el cambio constante de medio, al que finalmente añadimos sacarosa al 1%, nos llevó al establecimiento de callos en los medios de cultivo, callos que crecían lentamente (debido a la escasa presencia de energía) pero que llegaron a tener una sobrevivencia de 3 meses en los medios de cultivo. Estos callos eran de consistencia muy friable, muy claros, blancos en algunas zonas, casi transparentes en otras. Después de una desinfección aparecían zonas necrosadas en ellos, algunos sencillamente se deshacían en el alcohol. Todos los cultivos que pudimos salvar dieron como resultado el establecimiento de callos.

Al manipular el callo, y tratar de inducir en este la formación de raíces y/o brotes caulinares, fuimos perdiendo por infección todos los cultivos.

Estos resultados nos sorprendieron. Según la bibliografía consultada, parece que la obtención de callos en gimnospermas no es tarea fácil, ya que lo que se obtiene normalmente son yemas.

Con mejores condiciones de trabajo se puede

repetir el experimento, y extenderlo a obtener cultivos celulares, donde por la regeneración de unas pocas células, podamos obtener una planta entera. Entonces estaremos en condiciones de comenzar con las técnicas de manipulación genética.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Ahuja, M.R. y H.J. Huhs. 1985. "In vitro techniques in clonal propagation of forest tree species." En: In vitro techniques. Propagation and Long Term Storage. Schäfer - Menuhr ed.
- 2.- Ball, E. 1950. Differentiation in a callus culture of *Sequoia sempervivens*. Growth, 14: 295 - 325.
- 3.- Bornman Ch, y E. Jansson. 1982. Regeneration of plants from conifer leaf with special reference to *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. En: Colloque International sur la culture in vitro des essences Forestiers. IUFRO. AFOCEL. Nangis. France.
- 4.- Brown, C.L. y H.E. Sommer. 1982. Vegetative propagation of dicotyledonous trees. En: Tissue culture in forestry. Bonga and Durzan ed. The Hague.
- 5.- Chandler, S.F. y T.A. Thorpe, 1985. Culture of plant cells: techniques and growth media. En: Techniques in setting up and maintenance of tissue and cell cultures. Cell Biology. Vol. C1.
- 6.- FAO. World Resources, 1986.
- 7.- Gautheret, R.J. 1940. Recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'*Ulmus campestris*, cultivé in vitro. C.R. Acad. Sci. (Paris) 198: 2191 - 2196.
- 8.- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135 - 162.
- 9.- Comunicación personal. Vizcarra Sanchez, J. Profesor de Patología. Facultad de Ciencias Forestales. UNaM. Eldorado.
- 10.- Winton, L.L. 1970. Shoot and tree production from aspen tissue culture. Am. J. Bot. 57: 904 - 909.

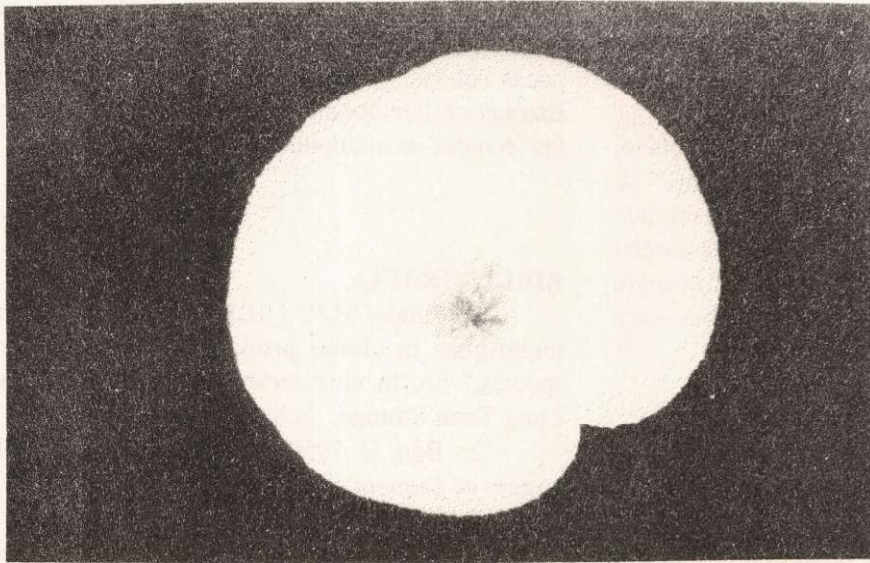


Figura 1.- Aspecto de un cotiledón a las tres semanas decultivo sobre medio basal + 1% sacarosa. 16 hr. luz de 1000 luxes de intensidad. Aumentado 8x

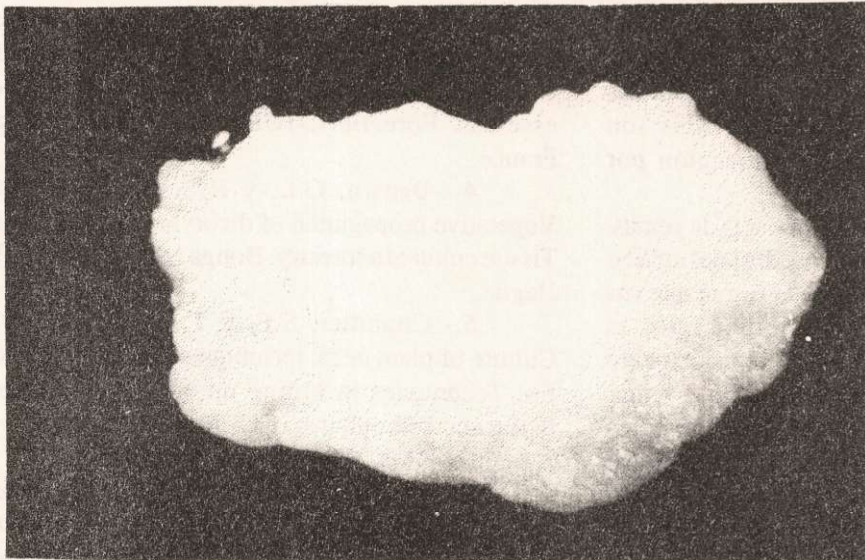


Figura 2.- Aspecto del cotiledón después de 5 semanas de cultivo. Aumentado 8x

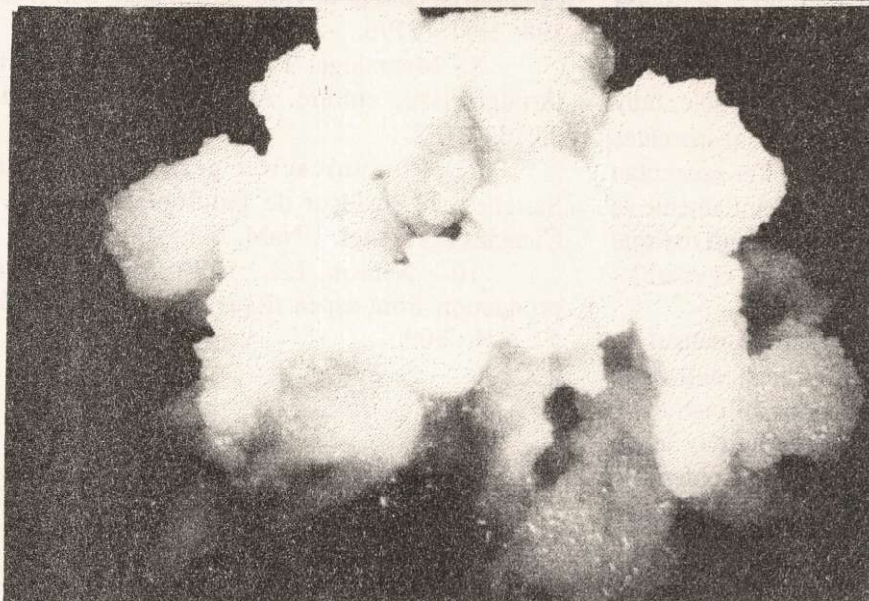


Figura 3.- Callo generado a partir del cultivo de cotiledones. El cotiledón alcanza esta apariencia a los dos meses de cultivo. Aumentado 8x.