

Cultivo *in vitro* de *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit: Efecto de las hormonas 2,4D y BA.

Niurka Morffi González*, Marta Arteaga Amador* y Marta Monzote Fernández**

*Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana

**Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes

RESUMEN

Se evaluó el efecto de diferentes combinaciones de BA y 2,4 D sobre el medio Murashige Skoog (1962), en ápices asépticos obtenidos a partir de semillas germinadas *in vitro* de *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit variedad Playa Rosario. Se observó el mayor número de brotes por ápice con la adición de 4,0 mg/L de BA. Bajas concentraciones de 2,4D (0,01- 0,5 mg/L) estimularon la dominancia ápical, dosis más elevadas (1,0 -3,0 mg/L) indujeron la formación de callo friable y favorecieron la dominancia ápical. Los brotes formados en medios de cultivo con BA (4,0mg/L) + 2,4D (0,01 mg/L) se diferenciaron de los formados con BA solo, en cuanto a: tipo de brote (múltiple con más de seis brotes por ápice), definición de las estructuras formadas y capacidad para continuar su crecimiento. Se discuten los resultados.

Palabras clave: *Leucaena leucocephala*, biotecnología, morfogénesis, Bencilaminopurina, 2,4 Diclorofenoxiacético

ABSTRACT

The effect of different combinations of BA and 2,4-D was evaluated on Murashige Skoog medium (1962), in aseptic apex obtained from *in vitro* germinated seeds of *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit, Playa Rosario variety. The greater number of shoots was observed with the addition of 4,0 mg/L of BA. Low concentration of 2,4-D (0,01 - 0,5 mg/L) stimulated the apex dominance, higher doses (1,0 -3,0 mg/L) induced the formation of friable calli and favoured apex dominance. The shoots formed in culture medium with BA (4,0 mg/L) + 2,4-D (0,01 mg/L) were different from those formed solely with BA, in respect to: shoot type (multiple with more than six shoots by apex), definition of the structures formed and capacity for continuous growth. Results are discussed.

Key words: *Leucaena leucocephala*, biotechnology, morphogenesis, Bencilaminopurin, 2,4 Diclorofenoxiacetic

INTRODUCCIÓN

Leucaena es uno de los géneros de las leguminosas de mayor perspectiva en la ganadería sostenible. Todas las especies tienen contenidos de proteína cruda entre 19 - 26%, comparado con el 2 - 11% presente en pastos y residuos de cultivos (Norton *et al.*, 1995), además de una alta digestibilidad, por lo que se considera un género con un gran potencial para la producción de leche y carne. La *Leucaena leucocephala* por su parte, es en muchos aspectos un árbol extremadamente útil y adaptable, puede ofrecer una multiplicidad de productos y servicios básicos, incluyendo leña, postes, forraje para el ganado, abono verde, alimento de sus hojas, vainas y semillas, así como sombra y conservación del suelo (Hughes, 1998).

Sin embargo, posee inconvenientes en su explotación por su porte erecto, que provoca pérdidas de disponibilidad de aproximadamente un 60% (Ruiz, 1987). Otra desventaja de esta especie es la presencia de mimosina en su composición, ésta sustancia es una tóxica suave pero puede conferir mala palatabilidad o producir ingestas lo que provoca una limitación en el consumo de menos de un 30%.

Trabajos realizados con el fin de mejorar estos caracteres por González *et al.* (1967) dan a conocer la obtención de

híbridos F_1 de *Leucaena leucocephala* x *Leucaena pulvurenta* Benth. que contienen un 75% menos de mimosina que la variedad Cunningham. Más recientemente Cruz *et al.* (1991) realizaron trabajos con radiaciones gamma en semillas de *Leucaena leucocephala*; uno de los resultados obtenidos fue la necesidad de altas dosis de radiaciones para inducir las mutaciones, lo que puede disminuir con el uso del cultivo *in vitro*, donde hay una mayor exposición de las células y por lo tanto más posibilidades de obtener mutantes útiles con dosis más bajas de radiaciones.

La aplicación de la biotecnología a *Leucaena leucocephala* se utiliza desde 1982, por Glovak *et al.* y Goyal *et al.* en 1985, propagaron exitosamente esta misma especie mediante la obtención de brotes a partir de yemas axilares; en nuestro país, Mesa *et al.* (1995) observaron que la concentración estimulativa de hormonas de crecimiento para inducir la morfogénesis en esta planta difiere con la variedad dentro de la misma especie.

Otra importante aplicación de la biotecnología en esta especie sería la propagación acelerada de mutantes útiles para la alimentación del ganado, que por la vía convencional (semillas) resultaría muy lenta a los efectos de introducirlos rápidamente en la producción.

El presente trabajo tiene el objetivo de obtener callos y brotes de *Leucaena leucocephala* variedad Playa Rosario a partir de ápices obtenidos de semillas germinadas **in vitro** para ser utilizados en tratamientos de mutagénesis inducida. Para ello se estudio el efecto de dos estimuladores del crecimiento: Bencilaminopurina (BA) y 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4D), así como el efecto combinado de estos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas de *Leucaena leucocephala* variedad Playa Rosario se desinfectaron con alcohol al 70% durante un minuto y Biclورو de mercurio 0,2% + tres gotas de Tween 80 por tres minutos, se enjuagaron en repetidas ocasiones con agua destilada estéril, se implantaron en medio de cultivo MS (medio basal de Murashige Skoog, 1962) distribuido en tubos de ensayo a razón de 10 mL por tubo y se incubaron a $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ y 5000 lux con fotoperíodos de 16 hr/luz.

A las vitroplantas obtenida a partir de semillas recién germinadas (con 11 cm de longitud) se le extirparon los ápices y se sembraron en medio MS + 0,5 - 1,0 - 2,0 - 2,5 - 3,5 - 4,0 - 4,5 - 5,0 mg/L de BA, en MS + 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 - 3,0 mg/L de 2,4 D y en MS + 4,0 mg/L de BA + 0,01- 0,05- 0,1- 0,5 mg/L de 2,4 D. Los cultivos se incubaron en iguales condiciones que las semillas. Se sembraron 20 ápices por medio de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas germinaron en un 95% a los 10 días de iniciados los cultivos y las plántulas crecieron favorablemente a pesar de la discreta fenolización observada en el medio de cultivo. A los 20 días ya estaban listas para ser donadoras del explanto (Fig. 1). Este método de iniciar los cultivos a partir de explantos asépticos es empleado con éxito desde 1982 por Glovak *et al.* debido, en lo fundamental, a que asegura la posibilidad de evitar los problemas de contaminación que aparecen cuando se trabaja con explantos obtenidos de plantas adultas. Además, Doreen *et al.* (1994) aseguran que los brotes obtenidos de ápices de plantas germinadas **in vitro** son más vigorosos y poseen un mayor potencial de multiplicación que los extirpados de plantas adultas.

La morfogénesis inicial de los brotes se observó a las cuatro semanas de iniciado el cultivo; la adición de BA al medio de cultivo para ápices de *Leucaena leucocephala* indujo la formación del mayor número de brotes múltiples por encima de 2,5 mg/L (Tabla I). Concentraciones inferiores reportaron bajos porcentajes de formación de brotes, los que generalmente fueron simples, además de pequeños callos friables.

Los mayores índices de brotación por ápices (3-4) se obtuvieron con 4,0 mg/L de BA (Fig. 2a). Al respecto,

resultados preliminares obtenidos por Mesa *et al.* (1995) demuestran que otras variedades de *Leucaena leucocephala* (Cunningham y CNIA - 250) requieren concentraciones superiores de BA (5 y 7 mg/L respectivamente) para la formación de brotes, lo que confirma los criterios de estos autores en cuanto a que la concentración estimulativa de citoquinina para la ocurrencia de este evento morfogénico en *Leucaena leucocephala*, difiere con la variedad.

Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de ampliar el rango óptimo de BA (2-3mg/L) propuesto por Goyal *et al.* desde 1985; además apoyan los criterios de estos autores en cuanto a la importancia del BA en la morfogénesis en *Leucaena*.

En cuanto al 2,4-D, observamos que bajas concentraciones de la auxina (0,05 - 0,5 mg/L) estimulan la dominancia apical, mientras que dosis más elevadas (1,0 - 3,0 mg/L) inducen la formación de callo friable y dominancia apical (Fig. 3), lo que nos permite evaluar como inefectiva la acción del 2,4-D respecto a nuestros objetivos, cuando se incluye solo en el medio de cultivo; además no se observó correspondencia del tamaño del callo con la concentración de la hormona. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Nagmani *et al.* (1983) en hipocótilos y segmentos de cotiledones

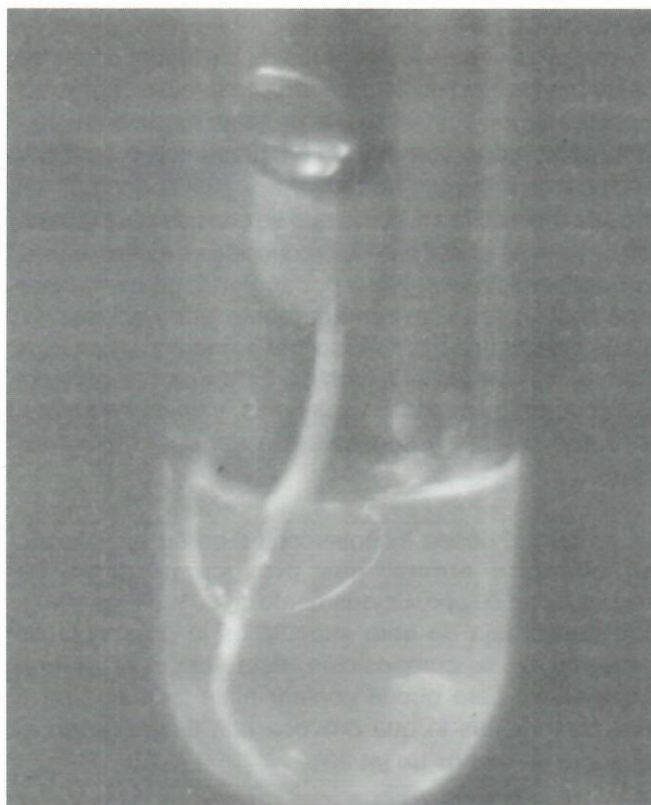


Fig. 1. Plántulas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit variedad Playa Rosario germinadas **in vitro** a los 20 días de iniciado el cultivo.

de *L. leucocephala*, *L. diversifolia* y *L. retusa*, lo que puede deberse a la respuesta del tipo de explanto utilizado. En nuestro trabajo puede haber además, una respuesta influenciada por la ausencia de un balance auxina/citoquinina que parece ser más apropiado para que se exprese la potencialidad morfogénica de los ápices de *L. leucocephala*.

La obtención de callo embriogénico, sería muy útil para desarrollar la técnica de embriogénesis somática como una vía más para propagar esta especie y desarrollar los tratamientos de mutagénesis inducida en los estadios más tempranos de los embriones somáticos; de hecho esto fue logrado por Nagmani *et al.* (1983) en *Leucaena diversifolia*, a partir de hipocótilos y secciones de

TABLA I

Efecto de diferentes concentraciones de BA en el cultivo de ápices de *Leucaena leucocephala* variedad Playa Rosario.

Conc. de BA (mg/L)	% de ápices con brotes	Tipos de brotes %	
		Múltiples	Simples
0,5	0	0	0
1,0	10	0	10
2,0	15	5	10
2,5	40	30	10
3,5	80	45	35
4,0	85	55	30
4,5	60	40	20
5,0	40	40	0

cotiledones. Sin embargo, con *L. leucocephala* y *L. retusa*, no obtuvieron resultados satisfactorios en este sentido; lo que demuestra el efecto de la especie, al igual que de la variedad en la respuesta de *Leucaena* ante los estimuladores del crecimiento.

En nuestro trabajo fue posible comprobar la efectividad del 2,4 D, a una concentración adecuada para estimular la ocurrencia del evento morfogénico deseado: la formación de brotes múltiples (Tabla II). Resultados similares obtuvieron Yashpal *et al.* (1985) con otra auxina, el ácido indolacético (IAA) en yemas laterales de *Leucaena*.

Los brotes formados en medios de cultivo con BA (4,0 mg/L) + 2,4D (0,01mg/L) fueron diferentes de los formados con BA solo, en cuanto a: tipo de brote (múltiple con más de seis brotes por ápice sembrado), definición de las estructuras formadas y capacidad para continuar su crecimiento (Fig. 2b). Los callos obtenidos con 4,0 mg/L de BA + 0,1 y 0,5 mg/L de 2,4D fueron pequeños y friables y en la combinación del BA con 0,5 mg/L de 2,4D se formaron pequeñas hojas a partir del callo friable.

Al igual que con el 2,4-D solo, se observó que no existe correspondencia entre el tamaño del callo y la concentración de 2,4-D en presencia de la citoquinina (Tabla II) y si se manifiestan diferencias en cuanto a la respuesta morfogénica del explanto.

La textura del callo obtenido no permitió su utilización para los tratamientos de mutagénesis inducida, mientras que la calidad de los brotes fue óptima para los objetivos trazados. Los estudios relacionados con la morfogénesis en *Leucaena* continuarán siendo objetivo de trabajos futuros



Fig. 2. Brotes de *Leucaena leucocephala* formados en medios con BA y combinaciones de BA y 2,4D. a) Mayores índices de brotación por ápices (3-4) con la adición de 4,0 mg/L de BA. b) Brotes múltiples (más de seis brotes por ápice), mejor definición de las estructuras formadas y mayor capacidad para continuar su crecimiento.

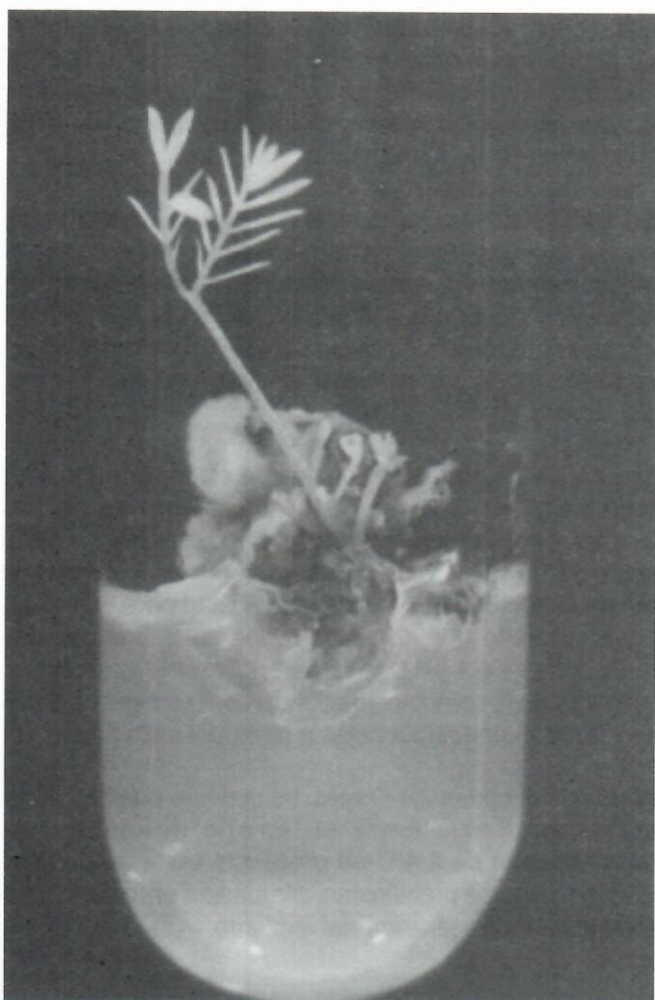


Fig. 3. Dominancia apical en medios de cultivo que incluyen dosis elevadas de 2,4D (1,0 - 3,0 mg/L).

por la importancia de esta género para la producción ganadera en nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

Cruz R, Herrera RS, Padrón E, Martínez RO, Monzote M, Tuero R y García M. 1991. Efecto de las radiaciones gamma en los pastos *Pennisetum purpureum* vc. King grass, *Cynodon nlefluence* vc. Jamaicano y *Leucaena leucocephala* vc. Peru. RCCA. 25(3): 305-310.

Doreen KL, Goh Marie - Clauda Bon y Monteuuis O. 1997. Prospects of Biotechnology for a rattan improvement programme. Bois et forêt des tropiques. 254(4): 51-67.

González V, Brewbaker JL and Hamill DE. 1967. *Leucaena leucocephala* x *Leucaena pulvurenta* Benth hybrids attainment. Crop Sc 7:140.

Goyal Y, Bingham RL and Felker P. 1985. Propagation of the tropical tree *Leucaena leucocephala* K - 67 by *in vitro* bud culture. Plant Cell Tissue Organ Culture.4:3-10.

Glovak L and Greatbatch W. 1982. Successful Tissue Culture of *Leucaena*. *Leucaena* Research Report. 3: 81-82.

Hughes CE. 1998. *Leucaena*. Manual de Recursos Genéticos. Adrian Barrance (Eds). ESA Consultores. Tegucigalpa, Honduras.

Nagmani R and Venketeswaran S. 1983. *In vitro* culture of hypocotyl and cotyledon segments of *Leucaena*. *Leucaena* Research Report. 4: 88-89.

Norton BW, Lowry B and Mc Sweeney C. 1995. *Leucaena* - opportunities and limitation. Proceeding of Workshop. Shelton H.M, Piggim C.M and Brewbaker J.L (Eds). Proceeding 57. ACIAR. Borgon, Indonesia.

Mesa A, Lajonchere G y Prieto Marlene. 1995. Micropropagación de la *Leucaena leucocephala* mediante nodos cotiledonares. Resultados preliminares. Libro de Resúmenes del Taller Nacional de Biotecnología Vegetal en Pastos, Cítricos y Caña de azúcar. Biotec' 95. EEPF. Indio Hatuey. Matanzas. Cuba.

Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

Ruiz T y Febles G. 1987. *Leucaena*: una opción para la alimentación bovina en el trópico y subtropical. EDICA. Ciudad de la Habana. Cuba.

Recibido: 3 de noviembre de 1999.

Direcc. de los autores: *Jardín Botánico Nacional, Carretera "El Rocío" km 3 ½, Calabazar, Boyeros. CP. 19230, Ciudad de La Habana, Cuba. ** Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, Carr. 43 No. km 1 ½ Cangrejas, Provincia Habana, Cuba.

TABLA II

Respuesta de los ápices de *Leucaena leucocephala* variedad Playa Rosario ante la adición de 4,0 mg/L de BA + diferentes concentraciones de 2,4D.

mg/L de 2,4D	Peso medio del callo(g)	Características	E.S ±
0,01	0,6309 ^a	Brotos múltiples	0,11
0,05	0,1471 ^b	Necrosis	0,11
0,10	0,8440 ^c	Callo friable y dominancia apical	0,14
0,50	0,5543 ^d	Callo friable y dominancia apical	0,13
Sigfn.	0,01		