

Regeneración de plantas de té (*Camellia sinensis*) por cultivo *in vitro* de meristemas, yemas axilares y segmentos uninodales *

Plant regeneration of tea (*Camellia sinensis*) by *in vitro* culture of meristems, axillary buds and uninodal segments

Sandra P. Molina ¹
María Laura Pérez ²

Hebe Y. Rey ³
Luis A. Mroginski ³

Originales: Recepción: 10/02/2012 - Aceptación: 30/08/2012

RESUMEN

Tres tipos de explantes de dos clones (CH 14 INTA y CH 318 INTA) de té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) fueron evaluados para su regeneración *in vitro*, bajo la influencia de dos citocininas (BAP y CIN) y una giberelina (AG₃). Previa desinfección, con etanol 70% (1 minuto) e hipoclorito de sodio 1,5% (20 minutos) y tres enjuagues con agua destilada estéril, los explantes fueron aislados y cultivados en los distintos medios de cultivo. Las mejores respuestas en formación de vástagos se registraron con los segmentos uninodales de ambos clones cultivados en el medio ½ MS + 1 mg/L de BAP o con el cultivo de yemas axilares del clon CH 14 INTA en el medio ½ MS + 1 mg/L de BAP o del clon CH 318 INTA en el medio ½ MS + 1 mg/L BAP + 1 mg/L AG₃. Los mejores resultados con el empleo de meristemas caulinares se obtuvieron en el medio ½ MS + 1 mg/L de CIN y 1 mg/L de AG₃. Los vástagos obtenidos fueron enraizados mediante su cultivo en ¼ MS + 6 mg/L de IBA.

ABSTRACT

Plants of two clones (CH 14 INTA and CH 318 INTA) of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) were regenerated by *in vitro* culture of three types of explants disinfected by immersion in 70% ethanol (1 min) and 1.5% sodium hypochlorite (20 min). The best medium for shoot regeneration from uninodal segments, for both clones, as well as for axillary buds of CH 14 INTA clone was ½ MS + 1 mg/L BAP. While the best medium for axillary buds of CH 318 clone was ½ MS + 1 mg/L BAP + 1 mg/L AG₃. For meristems culture, the best medium, for both clones was ½ MS + 1 mg/L KIN + 1 mg/L AG₃. Rooting of regenerated shoots were achieved by culture them on ¼ MS + 6 mg/L IBA.

Keywords

Camellia sinensis • meristem • axillary buds • uninodal segments • plant regeneration • micropropagation

Palabras clave

Camellia sinensis • meristemas • yemas axilares • segmentos uninodales • regeneración de plantas • micropropagación

* Trabajo subsidiado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

1 Investigadora Grupo Yerba Mate y Té, INTA - EEA Cerro Azul, Regional Misiones. C. C. 6, (3313) Cerro Azul, Misiones, Argentina. sandra@cerro.inta.gov.ar

2 Becaria de la ANPCyT y docente de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE.

3 Docente de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) y miembro de la Carrera de Investigador Científico y Tecnológico del CONICET.

INTRODUCCIÓN

El té -*Camellia sinensis* (Theaceae)- es económicamente importante sobre todo porque con sus hojas se elabora la bebida no-alcohólica más vieja del mundo que contiene cafeína. Es la bebida más consumida, solamente superada por el agua (16). Sus hojas tienen más de 700 constituyentes químicos entre los que se destacan vitaminas, flavonoides, aminoácidos, cafeína y polisacáridos con múltiples propiedades medicinales (6, 8, 9, 11, 14, 16, 20). En el mundo hay aproximadamente 2,7 millones de ha con una producción cercana a los 2,2 millones de t de hoja verde (11).

La región tealera argentina -unas 45000 ha- abarca la provincia de Misiones y norte de Corrientes y es la más austral del mundo. Las primeras plantaciones de té en Argentina datan de 1924, pero adquirieron importancia a partir de mediados de la década del 50. Inicialmente se realizaron introducciones de semillas provenientes de distintas partes del mundo. Luego, el acelerado ritmo de plantación llevó a la utilización de semilla de variada procedencia y calidad, dando como resultado una alta heterogeneidad (19).

La selección es la forma más común y antigua de mejoramiento del té. Al tratarse de una leñosa perenne, el mejoramiento convencional del té consume tiempo y trabajo (10, 11). La multiplicación de estos materiales seleccionados se realiza a través de la propagación vegetativa a partir de estacas nodales (8, 11, 23). Sin embargo, tal como lo señalaron Mondal *et al.* (11), este método de propagación está limitado por varios factores, tales como: 1) baja tasa de propagación; 2) falta de disponibilidad de material en invierno debido a la dormancia de las yemas; 3) baja tasa de sobrevivencia de ciertos clones debido al escaso enraizamiento y 4) variación estacional de la habilidad de enraizamiento de las estacas.

Por otra parte, las semillas de té son consideradas, desde el punto de vista de su conservación, como recalcitrantes o intermedias dado que no toleran la desecación y las exposiciones a bajas temperaturas; por este motivo la conservación de germoplasma durante largo tiempo usando semillas no es factible (4) y obliga a realizar su conservación manteniendo las plantas cultivadas en condiciones de campo con todos los problemas que ello implica (12).

Los problemas de la propagación vegetativa convencional del té, como asimismo la conservación de su germoplasma, podrían ser solucionados mediante el empleo de técnicas de cultivo de tejidos que permitirían la multiplicación de plantas selectas a gran escala (3), posibilitando la obtención de un gran número de individuos cuando el material es limitado (5), con lo que se haría posible la introducción de nuevos clones en un corto tiempo (6, 17, 18). Estas técnicas también permitirían su conservación en condiciones *in vitro* (21). Sin embargo, para que esto sea posible se debe contar con sistemas *in vitro* que brinden como producto final plantas.

Varios trabajos informan acerca de la regeneración *in vitro* de plantas de té mediante el cultivo de diferentes explantes (8, 9, 11). No obstante, el éxito de los cultivos depende del tipo y edad de los explantes y es altamente influido por el genotipo (11). Asimismo, con los clones de interés para Argentina, no existen estudios publicados sobre el tema.

En este trabajo se dan a conocer procedimientos que permiten la regeneración *in vitro*, mediante el cultivo de meristemas caulinares, yemas axilares y segmentos uninodales de dos clones de té seleccionados en Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con los clones: CH 14 INTA y CH 318 INTA, pertenecientes al Programa de Mejoramiento de la Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul del INTA (Provincia de Misiones). Como explantes se utilizaron meristemas (0,5 mm de longitud), yemas axilares y segmentos uninodales. Todos ellos fueron extraídos de plantas madre mantenidas en invernáculo, bajo un estricto control sanitario y nutricional.

En un flujo laminar de aire estéril se realizó la desinfección con etanol 70% (1 minuto) e hipoclorito de sodio 1,5% (20 minutos). Luego de tres enjuagues sucesivos con abundante agua destilada estéril, se procedió al aislamiento de cada explante. Los meristemas utilizados tenían 0,5 mm y consistían del domo y de por lo menos un primordio foliar. Los segmentos uninodales tenían entre 0,5 y 1 cm de longitud y contenían una yema axilar.

El cultivo *in vitro* de los explantes fue realizado en tubos de vidrio (25 mm x 120 mm; 40 ml de capacidad) conteniendo 10 ml de medio. Los medios fueron preparados usando las sales y vitaminas de Murashige & Skoog (13), reducido a la mitad ($\frac{1}{2}$ MS) con 3% de sacarosa y 0,7% de agar Sigma (A-1296). Los mismos fueron suplementados con diferentes concentraciones y combinaciones de 6-bencilaminopurina (BAP), cinetina (CIN) y ácido giberélico (AG_3). El pH del medio fue ajustado a 5,8 y posteriormente fue esterilizado en autoclave a 0,101 MPa por 15 minutos.

Los tubos que contenían los explantes fueron cubiertos con dos capas de Resinite® e incubados en una cámara de crecimiento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad con una intensidad de $116 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provista por lámparas fluorescentes frías.

Los vástagos regenerados *in vitro* fueron enraizados mediante su cultivo en $\frac{1}{4}$ MS suplementado con 3% de sacarosa y 6 mg/L de ácido indolbutírico (IBA). Las plantas obtenidas fueron transferidas a pequeñas macetas conteniendo turba, mantenidas en una atmósfera nebulizada durante 2 o 3 semanas con el objeto de aclimatizarlas.

Los experimentos fueron conducidos con un diseño de bloques completamente aleatorizados con tres repeticiones de 10 tubos cada una, con un explante/tubo. Los datos correspondientes al porcentaje promedio de explantes, con el error estándar (\pm SE), que produjeron vástagos (se contabilizaron como vástagos los que tenían 0,5 cm de longitud y por lo menos una hoja desplegada), fueron registrados luego de 60 días de cultivo. Los datos se analizaron mediante el análisis de la variancia (ANOVA) y las comparaciones de las medias fueron hechas usando el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de 30 días de cultivo el porcentaje de cultivos contaminados con bacterias y/u hongos fue relativamente bajo (en promedio, 15% contaminados con bacterias y 0,3% con hongos), mientras que el 85% restante, independientemente de los explantes y medios utilizados, permanecían vivos y libres de contaminación, en ambos clones. El ennegrecimiento tisular debido a la exudación de productos fenólicos desde los explantes a los medios de cultivo, considerado como uno de los principales problemas en la micropropagación del té (9) no tuvo mayor influencia con los explantes utilizados en este trabajo. Solamente el 0,95% de las yemas axilares del clon CH 318 INTA presentó ennegrecimiento tisular. Sin embargo, en experimentos preliminares con ápices caulinares, el ennegrecimiento tisular produjo la muerte de los explantes y los cultivos no pudieron ser establecidos (comunicación personal). La ocurrencia de explantes de té hiperhídricos (foto a), mencionada por Kataeva *et al.* (7), fue despreciable en este trabajo (0,8%) y se observó especialmente en medios que contenían 1 mg/L de BAP y 5 mg/L de AG_3 .

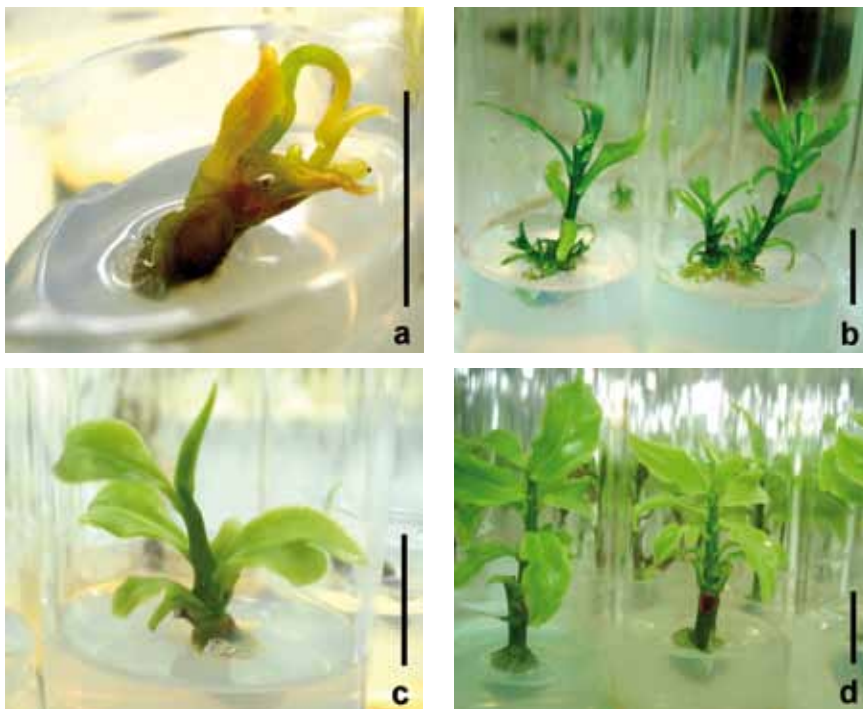


Foto. Regeneración de té por cultivo *in vitro*. **a)** Hiperhidricidad. **b)** Vástagos regenerados por cultivo de meristemas. **c)** Vástago regenerado por cultivo de una yema axilar. **d)** Vástagos regenerados por cultivo de segmentos uninodales. (Las barras verticales equivalen a 1 cm).

Photo. Regeneration of tea by *in vitro* culture. **a)** Hyperhidricity. **b)** Shoots regenerated by culture of meristems. **c)** Shoot regenerated by culture of an axilar bud. **d)** Shoots regenerated by uninodal segments. (Vertical bars = 1 cm).

Al cabo de 60 días de cultivo se pudo apreciar que los tres tipos de explantes utilizados de los dos clones, cultivados en todos los medios de cultivo, brindaron vástagos. Sin embargo, el porcentaje de explantes con vástagos y el número de vástagos por explante fue significativamente afectado por el clon, el tipo de explante y el medio empleado (tabla 1; tabla 2; tabla 3, pág. 132).

Tabla 1. Efecto de siete combinaciones de reguladores de crecimiento suplementados al medio ½ MS sobre la regeneración de vástagos mediante el cultivo *in vitro* de meristemas de dos clones de té.

Table 1. Effect of seven combinations of growth regulator added to ½ MS medium on the regeneration of shoots by *in vitro* culture of meristems of two tea clones.

Reguladores de crecimiento (mg/L)			Clon CH 14 INTA		Clon CH 318 INTA	
BAP	CIN	AG ₃	% de vástagos	N° vástagos/explante	% de vástagos	N° vástagos/explante
0	0	0	53,33 ^{ab}	1	56,67 ^{ab}	1,5
1	0	0	40,00 ^b	1	30,00 ^b	1
1	0	1	53,33 ^{ab}	1,5	20,00 ^{ab}	1
1	0	5	80,00 ^a	2	20,00 ^a	1
0	1	0	66,67 ^{ab}	2	53,33 ^{ab}	1,5
0	1	1	83,33 ^a	3	73,33 ^a	2
0	1	5	56,67 ^{ab}	1	53,33 ^{ab}	1

Tabla 2. Efecto de siete combinaciones de reguladores de crecimiento suplementados al medio ½ MS sobre la regeneración de vástagos mediante el cultivo *in vitro* de yemas axilares de dos clones de té.

Table 2. Effect of seven combinations of growth regulator added to ½ MS medium on the regeneration of shoot by *in vitro* culture of axillary buds of two tea clones.

Reguladores de crecimiento (mg/L)			Clon CH 14 INTA		Clon CH 318 INTA	
BAP	CIN	AG ₃	% de vástagos	N° vástagos/explante	% de vástagos	N° vástagos/explante
0	0	0	66,67 ^a	1	70,00 ^{bc}	1
1	0	0	83,33 ^a	3	60,00 ^c	3,5
1	0	1	76,67 ^a	2,2	100,00 ^a	3
1	0	5	86,67 ^a	1	86,67 ^{ab}	1
0	1	0	66,67 ^a	1	33,33 ^d	1
0	1	1	80,00 ^a	2	100,00 ^a	1,5
0	1	5	93,33 ^a	1	86,67 ^{ab}	1

Tabla 3. Efecto de siete combinaciones de reguladores de crecimiento suplementados al medio ½ MS sobre la regeneración de vástagos mediante el cultivo *in vitro* de segmentos uninodales de dos clones de té.

Tabla 3. Effect of seven combinations of growth regulator added to ½ MS medium on the regeneration of shoots by *in vitro* culture of uninodal segments of two tea clones.

Reguladores de crecimiento (mg/L)			Clon CH 14 INTA		Clon CH 318 INTA	
BAP	CIN	AG ₃	% de vástagos	Nº vástagos/explante	% de vástagos	Nº vástagos/explante
0	0	0	60,00 ^a	1	73,33 ^a	1
1	0	0	76,67 ^a	6	83,33 ^a	3
1	0	1	56,67 ^a	5,5	96,67 ^a	2
1	0	5	66,67 ^a	4,8	90,00 ^a	2
0	1	0	33,33 ^a	2,2	76,67 ^{ab}	1
0	1	1	53,33 ^a	2,2	50,00 ^{bc}	1
0	1	5	56,67 ^a	1,5	26,67 ^c	1

Con los meristemas de ambos clones, los mejores resultados se lograron con el uso de ½ MS suplementado con CIN (1 mg/L) y AG₃ (1 mg/L) donde el 83,33% de los meristemas del clon CH 14 INTA posibilitaron la regeneración de vástagos con un promedio de 3 vástagos por explante y el 73,33% de los meristemas del clon CH 318 INTA formaron vástagos con un promedio de 2 vástagos por explante (tabla 1, pág. 131; foto b, pág. 130). En ningún caso se apreció la formación de callos. La longitud promedio de los vástagos obtenidos fue de 1,5 cm. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Nakamura (14) quien informa que el AG₃ combinado con BAP estimula el crecimiento de ápices y yemas axilares de té cultivados *in vitro*. Sin embargo, los resultados de este trabajo muestran que las dosis de AG₃ que fueron adecuadas para el crecimiento de meristemas son muy inferiores a las utilizadas por Nakamura.

Los resultados obtenidos con el cultivo de yemas axilares muestran que en el caso del clon CH 14 INTA, si bien no hubo diferencias significativas entre los medios de cultivo ensayados en cuanto al porcentaje de yemas que formaron vástagos, el número de estos por explante fue superior cuando se adicionó solamente 1 mg/L de BAP al medio ½ MS. En este medio el 83,33% de las yemas cultivadas regeneraron vástagos, con un promedio de 3 vástagos (con una longitud promedio de 0,70 cm) por yema cultivada.

La adición de AG₃ si bien también estimuló el número de explantes que formaron vástagos, disminuyó el número promedio de estos por explante (tabla 2, pág. 131). Sin embargo, con las yemas del clon CH 318 INTA la mejor respuesta se obtuvo cuando además de la adición a ½ MS de 1 mg/L de BAP se incorporó 1 mg/L de AG₃. En este medio el 100% de las yemas cultivadas regeneraron vástagos con un promedio de 3 vástagos con una longitud promedio de 1 cm (foto c, pág. 130) por explante (tabla 2, pág. 131).

Con el cultivo de segmentos uninodales, de ambos clones, los mejores resultados fueron obtenidos en el medio $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg/L de BAP. En este medio 76,67% de los segmentos uninodales del clon CH 14 INTA regeneraron vástagos con un promedio de 6 vástagos con una longitud promedio de 1,8 cm (foto d, pág. 130) por explante, mientras que el 83,33% de los segmentos uninodales del clon CH 318 INTA formaron vástagos con un promedio de 3 vástagos (con 1,3 cm de longitud) por explante (tabla 3, pág. 132).

El 98% de los vástagos enraizaron *in vitro* en el medio similar al sugerido por Pandidurai *et al.* (15) consistente de $\frac{1}{4}$ MS suplementado con 3% de sacarosa y 6 mg/L de IBA. La aclimatización permitió que entre el 80 y 90% de plantas obtenidas sobrevivieran exitosamente, superando una de las fases más críticas de la micropropagación del té (11).

Los resultados de este trabajo muestran que, en general, si bien hay regeneración en todos los medios utilizados, incluido $\frac{1}{2}$ MS desprovisto de reguladores de crecimiento, para la obtención de los máximos valores de regeneración, en las condiciones de trabajo establecidas, es necesaria la adición de por lo menos BAP, y/o CIN y/o AG₃, dependiendo del clon y del explante que se cultiva. En este sentido los resultados de este trabajo concuerdan con lo informado por Mondal *et al.* (11), aunque los protocolos que aquí se describen se caracterizan por la simplicidad de los medios de cultivo evaluados para inducir la regeneración de plantas a partir del cultivo de segmentos nodales cuando se los compara con los utilizados por varios investigadores que utilizaron además del medio MS, extracto de levadura, leche de coco, ácido indolacético y BAP (1, 2). Asimismo, con la utilización de yemas axilares, los medios sugeridos en este trabajo son muy simples y difieren de los recomendados por otros autores (22).

Por otra parte, este trabajo muestra por primera vez que es posible la regeneración de plantas de té a partir de meristemas caulinares.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que es posible la obtención de plantas de dos clones adultos de té -de interés para Argentina- mediante el cultivo *in vitro* en medios sencillos de meristemas, yemas axilares y segmentos uninodales, con niveles mínimos de contaminación y de oxidación de tejidos.

La evaluación y ajuste de esta tecnología, en el resto de los clones pertenecientes al banco de germoplasma, posibilitará encarar estudios que permitan su aplicación para la conservación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal, B.; Singh, U.; Banerjee, M. 1992. *In vitro* clonal propagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze). Plant Cell Tissue & Organ Culture. 30: 1-5.
2. Banerjee, M.; Agarwal, B. 1990. *In vitro* rooting of tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. 1990. Indian Journal of Experimental Biology. 28: 936-939.
3. Bhaskaran, S.; Prabhudesai, V. R. 1989. Tissue culture of plantation crops. En: Dhawan V. Applications of Biotechnology in Forestry and Agriculture 8: 87-107.
4. Chaudhary, R.; Lakhanpal, S.; Chandel K. P. S. 1990. Germination and desiccation tolerance of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) seeds and feasibility of cryopreservation. Sri Lanka. Journal of Tea Science. 59: 89-94.
5. Chen, L.; Zhou, Z. X.; Yang, Y. J. 2007. Genetic improvement and breeding of tea plant (*Camellia sinensis*) in China: from individual selection to hybridization and molecular breeding. Euphytica. 154: 239-248.
6. Islam, G. M. R.; Iqbal, M.; Quddus, K. G.; Ali, M. Y. 2005. Present status and future needs of tea industry in Bangladesh. Review. Proc. Pakistan Academy of Science. 42: 305-314.
7. Kataeva, N. V.; Alexandrova, I. G.; Butenko, R. G.; Dragavtceva, E. V. 1991. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. Plant Cell, Tissue & Organ Culture. 27: 149-154.
8. Kato, M. 1989. *Camellia sinensis* L. (Tea): *In vitro* Regeneration. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants II (Bajaj, Y. P. S. ed.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Vol.7: 82-98.
9. Mondal, T. K. 2003. Micropropagation of tea (*Camellia sinensis* L.). In: Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Jain, S. M.; Ishii, K. (eds.). Forestry Science. Kluwer Academic Publishers. 671-720.
10. Mondal, T. K.; Bhattacharya, A.; Laxmikumaran, M.; Ahuja, P. S. 2004. Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology. Plant Cell, Tissue & Organ Culture. 76: 195-254.
11. Mondal, T. K. 2007. Tea. En: Pua E. C.; Davey, M. R. (eds.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Crops V. Springer-Verlag Berlin. 60: 519-535.
12. Mroginski, L. A.; Roca, W. M.; Kartha, K. K. 1993. Crioconservación del germoplasma. En: Roca, W. M.; Mroginski, L. A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT, Cali, Colombia. 715-730.
13. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.
14. Nakamura, Y. 1991. *In vitro* propagation techniques of tea plants. JARQ. 25: 185-194.
15. Pandidurai, V.; Murali, K. S.; Manivel, L.; Rajkumar, R. 1996. Factors affecting *in vitro* shoot multiplication and root regeneration in tea. Journal of Plant Crops 24: 603-609.
16. Patel, S.H. 2005. *Camellia sinensis*: Historical perspectives and future prospects. Journal of Agromedicine. 10: 57-63.
17. Phukan, M. K.; Mitra, G. C. 1990. Nutrient requirements for growth and multiplication of tea plants *in vitro*. Bangladesh Journal of Botany. 19: 65-71.
18. Prakash, O.; Sood, A.; Sharma, M.; Ahuja, P. S. 1999. Grafting micropropagated tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) shoots on tea seedlings – a new approach to tea propagation. Plant Cell Reports. 18: 883-888.
19. Prat Kricun, S. D. 1990. Selección clonal en té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) en la República Argentina. En: Fontana, H.P.; Prat Kricun, S. D.; Belingheri, L. D. Catado de té. Informe técnico: INTA Cerro Azul (Misiones). 24 p.
20. Prat Kricun, S. D. 2005. Contenido de catequinas en cultivares clonales de té (*Camellia sinensis*), elaborados como té negro y té verde sencha. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNAM), Posadas. 116 p.
21. Scocchi, A.; Rey, H. 2004. Conservación de germoplasma *in vitro*. En: Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L. (eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal INTA, Buenos Aires. 179-185.
22. Tahardi, J. S.; Shu, W. 1992. Commercialization of clonal micropropagation of superior tea genotypes using tissue culture technology. USAID/CDR Network meeting on tea crop biotech. Costa Rica.
23. Tahardi, J. S.; Riyadi, I.; Dodd, W.A. 2003. Enhancement of somatic embryo development and plantlet recovery in *Camellia sinensis* by temporary liquid immersion. Journal Bioteknologi Pertanian. 8(1): 1-7.