

# COMPARACIÓN DE INDUCCIÓN RIZOGENICA EN EXPLANTES ADULTOS DE AVELLANO EUROPEO (*Corylus avellana* L.) POR *Agrobacterium rhizogenes* Y ÁCIDO INDOLBUTÍRICO

## Comparisons of root induction in mature filbert (*Corylus avellana* L.) explants by *Agrobacterium rhizogenes* and indolbutyric acid

Manuel Sánchez-Olate<sup>1\*</sup>, Patricia Sáez<sup>1</sup>, Priscila Cartes<sup>1</sup>, Carolina Alvarez<sup>1</sup>, Darcy Ríos<sup>1</sup>

### ABSTRACT

From *in vitro* cultured adult material of *Corylus avellana* L. cv. Negretta, adventitious rooting of microshoots was evaluated. Rhizogenic induction mediated by two strains of wild-type *Agrobacterium rhizogenes* (A477 y A478) and indolbutyric acid (IBA) were compared, under two different light conditions (16:8 h photoperiod and complete darkness). The results indicate that in the 16:8 h photoperiod induction, rooting rate with IBA (90%) was significantly greater than the obtained with strain A477 of *A. rhizogenes* (67.7%), while as with the strain A478 no statistical significance was obtained for the same variable (75%). On the other side, under complete darkness, rooting mediated by IBA (90%) significantly overcame the results obtained with both strains of *A. rhizogenes* (40 and 20%, for A478 y A477, respectively). In terms of the morphological variables of the resulting root system, the induction mediated by IBA, under the 16:8 h photoperiod, generates significantly greater number of roots (19 roots per microshoot) than the obtained with *A. rhizogenes* (mean 3.7 roots per microshoot), producing significant differences when comparing the results with strain A478 (5 roots per microshoot) with those of the strain A477 (2.4 roots per microshoot). The induction under complete darkness does not have any effects in root number, independently of the rhizogenic inductor employed. On the other side, root length did not present significant differences among treatments, except in the presence of *A. rhizogenes* A477 and darkness.

**Key words:** rooting, *Agrobacterium rhizogenes*, european hazelnut.

### RESUMEN

---

<sup>1</sup>Universidad de Concepción, Facultad de Ciencia Forestales, Casilla 160 C, Concepción, Chile. E-mail: msanche@udec.cl \*Corresponding Author.

A partir de material adulto de *Corylus avellana* L. cv. Negretta cultivado *in vitro*, se evaluó el enraizamiento adventicio de microtallos, comparándose la inducción rizogénica mediada por dos cepas silvestres de *Agrobacterium rhizogenes* (A477 y A478) y ácido indolbutírico (IBA), bajo dos condiciones de luminosidad (fotoperíodo de 16:8 h y oscuridad completa). Los resultados muestran que en la inducción bajo fotoperíodo de 16:8 h, la tasa de enraizamiento con IBA (90%) fue significativamente mayor a la obtenida con la cepa A477 de *A. rhizogenes* (67,7%), mientras que con la cepa A478 no hubo significancia para la misma variable (75%). Por otra parte, bajo oscuridad completa el enraizamiento mediado por IBA (90%) superó significativamente los resultados obtenidos con ambas cepas de *A. rhizogenes* (40 y 20%, para A478 y A477, respectivamente). En cuanto a las variables morfológicas del sistema radicular resultante, la inducción por IBA bajo fotoperíodo de 16:8 h, generó un número de raíces significativamente mayor (19 raíces por microtallo) que las obtenidas con *A. rhizogenes* (3,7 raíces promedio por microtallo), produciéndose diferencias significativas al comparar los resultados de la cepa A478 (5 raíces por microtallo) con aquellos de la cepa A477 (2,4 raíces por microtallo). La inducción bajo oscuridad completa no produjo efectos en el número de raíces, independiente del inductor rizogénico utilizado. Por otro lado, la longitud de raíces no presentó diferencias significativas entre tratamientos, excepto en presencia de *A. rhizogenes* A477 y oscuridad.

**Palabras clave:** enraizamiento, *Agrobacterium rhizogenes*, avellano europeo.

## INTRODUCCIÓN

Estudios realizados por Sánchez–Olate *et al.* (2004a) en micropropagación de *Corylus avellana*, informan una buena respuesta a la estimulación de varetas para el desarrollo de yemas vegetativas y factibilidad de utilización de brotes epicórmicos en cultivo y multiplicación *in vitro*. Sin embargo, no se pueden establecer normas generales que permitan asegurar el éxito del posterior enraizamiento y aclimatación de las plántulas (Preece *et al.*, 1989), puesto que las respuestas varían según el genotipo, ontogenia, posición del material utilizado y principalmente las condiciones de cultivo y manipulación *in vitro* (Leslie y McGranahan, 1992; Kozai *et al.*, 2005; Hazarika, 2006). Esto obliga al estudio de técnicas que permitan mejorar las características de la planta con énfasis en el sistema radicular, para su posterior traslado a campo (Gonçalves *et al.*, 1998).

*Agrobacterium rhizogenes* es un organismo común del suelo capaz de infectar una planta a través de una herida y la inserción y expresión de genes codificantes para ácido indolacético (AIA) de su t-DNA y causar abundante proliferación de raíces secundarias (Ercan *et al.*, 1999). Dicho fenómeno natural y también inducido constituye una alternativa posible de utilizar en la producción de plantas *in vitro*. El mecanismo subyacente de la formación de raíces adventicias es la transferencia de varios genes bacterianos al genoma de la planta, específicamente, la transferencia de la porción T-ADN del plásmido Ri ("Root Inducing") (McAfee *et al.*, 1993; Ercan *et al.*, 1999; Li y Leung, 2003). Los síntomas observados con *A. rhizogenes* son el aumento de la sensibilidad de las células al efecto de las auxinas, más que de la producción de éstas (Ercan *et al.*, 1999). Así, utilizando esta técnica, Caboni *et al.* (1996) informaron tasas de enraizamiento de entre 52 y 68% en microtallos de nogal (*Juglans regia* L. cv. Sorrento), siendo éstos transferidos exitosamente después a condiciones *ex vitro*. Estudios realizados por Caro *et al.* (2000) en *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz reportan que las raíces obtenidas en estos cultivos se caracterizan por un alto grado de estabilidad genética, lo que permite la generación de plantas completas y viables.

La aplicación de *A. rhizogenes* ha sido descrita como una vía factible que permite incrementar las respuestas rizogénicas en muchas especies forestales, entre ellas aquellas pertenecientes al género *Pinus*, *Larix* y *Eucalyptus* (Caro *et al.*, 2000). Sabiendo que los programas de mejoramiento genético son lentos y que la inducción de genes específicos a través de ciclos de cruzamiento resulta difícil, la utilización de *A. rhizogenes* puede ser una alternativa exitosa como ruta rápida y directa de introducción y expresión de genes específicos para el enraizamiento (Huang *et al.*, 1991).

Sobre la base de estos antecedentes, el objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta rizogénica inducida por *A. rhizogenes* y ácido indolbutírico (IBA) bajo dos condiciones de luminosidad en microtallos de *Corylus avellana* cv. Negretta, de origen adulto. Este tipo de material resulta recalcitrante al enraizamiento adventicio por los métodos convencionales, por esto nuevas metodologías de enraizamiento pueden facilitar la producción de plantas con genotipos de interés, convenientemente probados en campo antes de su propagación comercial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron microtallos procedentes de cadenas proliferativas originadas a partir de yemas vegetativas de *C.*

*avellana* cv. Negretta crecientes de varetas y brotes epicórmicos, según metodología descrita por Sánchez-Olate *et al.* (2004a). El medio de cultivo utilizado para la inducción rizogénica fue MS2 (medio Murashige y Skoog modificado) (Sánchez-Olate *et al.*, 1997), suplementado con 2,5 mg L<sup>-1</sup> benzilaminopurina (BAP), 0,01 mg L<sup>-1</sup> ácido 3-indolacético (AIA), 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. Posteriormente el pH se ajustó a 5,8 para finalmente adicionar 7 g L<sup>-1</sup> de agar agar. Una vez obtenida la mezcla, ésta se esterilizó en autoclave a 120 °C y a 0,101 MPa durante 20 min.

### **Cultivo bacteriano**

Las cepas bacterianas utilizadas correspondieron a las cepas silvestres A477 y A478 de *A. rhizogenes*, procedentes de la colección de la Universidad de Valencia, España (Universidad de Valencia, 1990). La reactivación del crecimiento de las bacterias se realizó tomando una alícuota de la solución bacteriana y resuspendiéndola en 2 mL de medio YMB (yeast medium bacterial) líquido para su multiplicación (Hooykaas *et al.*, 1977). Esta suspensión se agitó durante 48 h a 300 rpm y a una temperatura de 27 °C, para posteriormente coger alícuotas de 100 µL y resuspenderlas en 2 mL de medio YMB líquido, en tubos de un volumen de 10 mL. Finalmente, para el desarrollo de las colonias bacterianas, alícuotas de 100 µL se cultivaron en placas Petri con 10 mL de medio YMB solidificado con 8 g L<sup>-1</sup> agar Difco®, manteniéndose éstas a 28 °C durante 24 h en posición invertida para evitar evaporación.

### **Inoculación de microtallos**

Una vez desarrolladas las colonias, se sembraron las bacterias en 20 mL de medio YMB líquido utilizando un asa microbiológica. Posteriormente, la solución se dispuso en placas Petri estériles para proceder a la inoculación de microtallos de 2,5 cm de longitud procedentes de los mejores tratamientos obtenidos en ensayos preliminares (Sánchez-Olate *et al.*, 2004a). La inoculación basal de éstos se realizó sumergiéndolos durante 3 min en las soluciones bacterianas (A477 y A478) y auxínicas (IBA 3 mg L<sup>-1</sup>), tras eliminar las yemas axilares desde la base de los microtallos y practicarles un corte longitudinal de 0,5 cm en esa zona para aumentar la superficie de infección. Inmediatamente después de inocular y antes de introducir los microtallos en el medio de cultivo, éstos se secaron con papel filtro estéril.

Posteriormente los microtallos se cultivaron en medio sin reguladores de crecimiento (MS) por 3 días. Durante este período se aplicaron dos condiciones de luminosidad (fotoperíodo de 16:8 h y oscuridad completa), con temperatura de 25 ± 1 °C en el día y 22 ± 1 °C en la noche y una humedad ambiental en cámara de crecimiento de 60%. En fotoperíodo de 16:8 h, la intensidad lumínica de la cámara fue de 40

$\mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Luego los microtallos se llevaron a medio MS con los macronutrientes reducidos a un 25% de su concentración original, mezclado con vermiculita esterilizada en autoclave (200/250 v/v) y solidificado con 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma). A esta mezcla se agregaron 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  del antibiótico Cefotaxima (Claforan<sup>®</sup>) para controlar el desarrollo bacteriano. La evaluación de la respuesta rizogénica se realizó al finalizar el período de inducción de 30 días. Al cabo de este período se evaluó el porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raíces.

### **Análisis estadístico**

Se evaluaron seis tratamientos: T1: oscuridad completa más A478; T2: oscuridad completa más A477; T3: oscuridad completa más 3 mg mL<sup>-1</sup> de IBA; T4: fotoperíodo de 16:8 h más A478; T5: fotoperíodo de 16:8 h más A477 y T6: fotoperíodo de 16:8 h más 3 mg mL<sup>-1</sup> de IBA. La unidad experimental correspondió a un recipiente de vidrio con cuatro explantos de características macromorfológicas homogéneas, con cuatro repeticiones por unidad experimental. Se utilizó un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial (2 x 3), realizando un análisis descriptivo univariado (ANDEVA) con una probabilidad de 95%. Las diferencias significativas se identificaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (P = 0,05) con corrección de Kramer (Steel y Torrie, 1985).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los porcentajes de enraizamiento más altos correspondieron a aquellos tratamientos que utilizaron inducción auxínica (90%), no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos T3 y T6, independiente de la condición de luminosidad utilizada (**Cuadro 1**). Tampoco existieron diferencias significativas entre estos tratamientos y el tratamiento T4, cepa A477 con fotoperíodo de 16:8 h, pero manifestó un menor porcentaje de enraizamiento (75%) comparado con la inducción auxínica en igual condición lumínica (**Cuadro 1**). Sin embargo, el mayor número de raíces se observó en tratamientos que utilizaron inducción auxínica con fotoperíodo de 16:8 h, con un promedio de 19 raíces por microtallo, esto se relaciona con el porcentaje de raíces obtenido en T6 (90%), existiendo diferencias significativas entre los tratamientos. La longitud de raíces alcanzada en los tratamientos con inducción auxínica (22,2 y 38,4 para T3 y T6, respectivamente) no presentó diferencias significativas con la inducción de A477 en oscuridad completa, el cual presentó una mayor elongación de los microtallos con 75,5 mm (**Figura 1**).

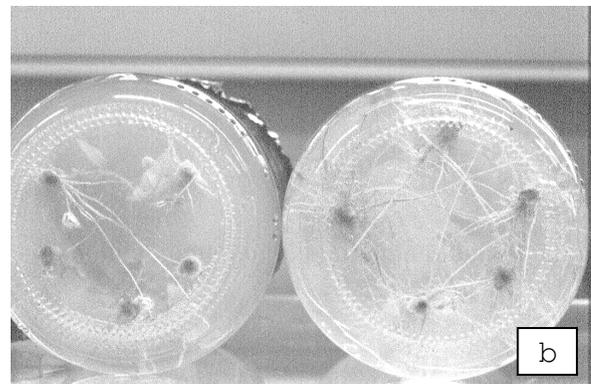
**Cuadro 1. Evaluación rizogénica en microtallos de *Corylus avellana* en los diferentes tratamientos aplicados, considerando 16 microtallos por tratamiento.**

**Table 1. Rooting evaluation in microstems of *Corylus avellana* in the different applied treatments, including 16 microshoots by treatment.**

Tratamientos	Enraizamiento	Número de raíces por explante	Longitud de raíces
	%		mm
T1	40,0a	4,3a	20,0a
T2	20,8b	4,7a	75,5b
T3	90,0c	4,8a	22,2a
T4	75,0cd	5,0a	17,2a
T5	67,7d	2,4b	19,0a
T6	90,0c	19,0c	38,4a

Letras distintas en la columna indican diferencias significativas según test de Tukey (P = 0,05).

T1: oscuridad completa más cepa A478 de *Agrobacterium rhizogenes*; T2: oscuridad completa más cepa A477; T3: oscuridad completa más 3 mg L<sup>-1</sup> IBA; T4: fotoperíodo de 16:8 h más cepa A478; T5: fotoperíodo de 16:8 h más cepa A477; y T6: fotoperíodo de 16:8 h más 3 mg L<sup>-1</sup> IBA.



**Figura 1. Respuesta rizogénica en microtallos de *Corylus avellana*. (a) Longitud de raíces; (b) manifestación rizogénica *in vitro*, después de 30 días de cultivo en el tratamiento con fotoperíodo de 16:8 h y 3 mg L<sup>-1</sup> ácido indolbutírico (T6).**

**Figure 1. Rooting response of of *Corylus avellana* microshoots. (a) Root length; (b) *in vitro* rooting, after 30 d culture in treatment T6 (photoperiod 16:8 h and 3 mg L<sup>-1</sup> indolbutyric acid).**

Los resultados obtenidos podrían estar influenciados por el genotipo de la cepa bacteriana, la especie a inducir y las condiciones de cultivo. Así, las diferencias encontradas entre las cepas utilizadas fueron

dependientes del tipo de cepa, lo que según Ercan *et al.* (1999) es un factor importante en la inducción de raíces adventicias. Estos resultados concuerdan con lo informado por Dobigny *et al.* (1995), quienes trabajando con dos cultivares de papa (*Solanum tuberosum* L.) y cuatro cepas distintas de *A. rhizogenes* encontraron que dos de ellas (2659 y 2659 GUS) inducían fuertemente la formación de raíces adventicias, en cambio las cepas 15834 y 8196 GUS provocaban baja a nula respuesta en la inducción rizogénica.

Otro factor importante es el medio de cultivo que influye significativamente en la formación de raíces adventicias (Giri y Narasu, 2000). Medios con alta concentración salina como el MS, inducen la formación de raíces, la cual se ve beneficiada al aplicar reguladores del crecimiento como las auxinas, siendo significativamente mayor el porcentaje de enraizamiento en estas condiciones, independiente de las condiciones de luminosidad utilizadas en la etapa de inducción. Este efecto del medio MS ha sido observado en *Nothofagus alpina* (Sánchez-Olate *et al.*, 2004b), donde el efecto estresante del medio salino, resulta en la expresión rizogénica espontánea cuando los microtallos son cambiados a un medio reducido en macronutrientes.

Los resultados obtenidos en esta etapa de la investigación no permiten visualizar la inoculación de microtallos de *C. avellana* con las cepas bacterianas estudiadas y las condiciones de cultivo utilizadas como una alternativa para mejorar la inducción rizogénica. Sin embargo, dada las experiencias informadas por Banerjee *et al.* (1998) y Li y Leung (2003), donde al inocular material vegetal con *A. rhizogenes* y cultivar en un medio suplementado con IBA, no sólo el porcentaje de enraizamiento aumenta sino que también el número de raíces, es recomendable investigar el uso combinado de estos agentes inductores en ensayos posteriores. En este sentido Ercan *et al.* (1999) reporta que los síntomas observados con *A. rhizogenes* son efecto de un aumento de la sensibilidad de las células al efecto de las auxinas, más que de la producción de éstas, lo que concuerda con lo informado por Caro *et al.* (2003), quienes trabajando con *P. chilensis* informaron altos porcentajes de enraizamiento en aquellos tratamientos que utilizaron en forma conjunta la inducción mediada por *A. rhizogenes* y auxinas. A pesar de las altas tasas de enaraizamiento informadas por estos autores, no se encontraron diferencias significativas entre aquellos tratamientos que utilizan en forma separada la inducción mediada por bacteria o por auxina. Para el caso de *C. avellana* las diferencias son significativamente altas, por lo que la utilización de *A. rhizogenes* sería presumiblemente ventajosa sólo si las diferencias en su favor resultasen en una mayor supervivencia y crecimiento de las plantas una vez transferidas a campo.

## CONCLUSIONES

El mayor porcentaje de enraizamiento se obtuvo en tratamientos con inducción auxínica, independiente de las condiciones de luminosidad utilizadas en la etapa de inducción. En general el número de raíces no presentó diferencias significativas entre los tratamientos. La longitud de raíces no presentó diferencias significativas entre tratamientos, excepto en oscuridad con cepa A477 en donde se observaron raíces más cortas que en los demás tratamientos.

## LITERATURA CITADA

Banerjee, S., L. Rahman, G.C. Uniyal, and P.S. Ahuja. 1998. Enhanced production of valepotriate by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy roots cultures of *Valeriana wallichii* DC. Plant Sci. 131:203-208.

Caboni, E., P. Lauri, N. Tonelli., G. Falasca, and C. Damiano. 1996. Root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in walnut. Plant Sci. 118:203-208.

Caro, L., P. Marinangeli, N.R. Curvetto, and C. Hernández. 2000. *Agrobacterium rhizogenes* vs. inducción auxínica para la rizogénesis *in vitro* de *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz. Multequina (Mendoza) 9:47-53.

Caro, L., P. Marinangeli, N.R. Curvetto, C. Hernández, and N. Santecchia. 2003. *Agrobacterium rhizogenes* v/s auxinic induction for *in vitro* rhizogenesis of *Prosopis chilensis* and *Nothofagus alpina*. Biocell 27(3):311-318.

Dobigny, A., A. Ambrose, R. Haicour, C. David, L. Rossignol, and D. Sihacharkr. 1995. Transformation of potato using mannopine and cucumpine strains *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 40:225-230.

Ercan, G., S. Yuce, K. Turgut, and M. Taskin. 1999. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. populations grown in Turkey. Turk. J. Bot. 23:373-377.

Giri, A., and M.L. Narasu. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnol. Adv. 18:1-22.

Gonçalves, J.C., G. Diogo, and S. Amancio. 1998. In vitro propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): effects of rooting treatments on plant survival and anatomical changes during adventitious root formation. *Sci. Hort. (Canterbury, Engl.)* 72:265-275.

Hazarika, B. 2006. Morpho – physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci. Hort. (Canterbury, Engl.)* 108:105-120.

Hooykaas, P.J.J., P.M. Klapwijk, M.P. Nuti, R.A. Schilperoort, and A. Rorsch. 1977. Transfer of the *A. tumefaciens* ti plasmid to avirulent *Agrobacteria* and *Rhizobium* ex planta. *J. Gen. Microbiol.* 98:477-484.

Huang, Y., A. Diner, and F. Karnosky. 1991. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation of a conifer: *Larix deciduas*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 27: 201-207.

Kozai, T., F. Afreen, and S. Zobayed. 2005. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. 316 p. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Leslie, C., and G. McGranahan. 1992. Micropropagation of Persian Walnut (*Juglans regia* L.). p. 137-150. *In* Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry. High Technology and Micropropagation II.* Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

Li, M., and D. Leung. 2003. Root induction in radiate pine using *Agrobacterium rhizogenes*. *Electron. J. Biotechnol.* 6(3): 254-270.

McAfee, B., E. White, L. Pelcher, and M. Lapp. 1993. Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) ssp. using *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 34:53-62.

Preece, J.E., J.W. Van Sambeek, C.A. Huetteman, and G.R. Gaffney. 1989. *In vitro* studies with walnut (*Juglans*) species. p. 159-180. *In* Phelps, J.E. (ed.) *The continuing quest for quality. Proceed. 4th Black Walnut Symp., Carbondale, Illinois, USA.*

Sánchez-Olate, M., D. Ríos, M. Gea, R. Rodríguez, and M. Revilla. 1997. Parameters affecting the *in*

*in vitro* growth and rooting of *Juglans regia* L. Acta Hort. (ISHS) 442:235-240.

Sánchez-Olate, M., D. Ríos, R. Rodríguez, M.E. Materán, y G. Pereira. 2004a. Duración del efecto revigorizante de podas severas de plantas adultas de avellano europeo (*Corylus avellana* L.) cv. Negretta sobre el cultivo *in vitro*. Agric. Téc. (Chile) 4:338-346.

Sánchez-Olate, M., D. Ríos, M. Pedraza, G. Pereira, H. Castellanos, y R. Escobar. 2004b. Propagación *in vitro* de *Nothofagus procera* ((Poepp. & Endl.) Oerst.) a partir de embriones aislados. Bosque 25(1):123-28.

Steel, R.G.D., y J.H. Torrie. 1985. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2ª ed. 622 p. McGraw-Hill, Bogotá, Colombia.

Universidad de Valencia. 1990. Spanish type culture collection. 3ª ed. 316 p. Universidad de Valencia, Facultad de Ciencias Biológicas, Valencia, España.