

Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae)

Rogelio Sotolongo Sospedra, Maurilio García López, Leoncio Junco Cruz, Gretel Geada López y Esteban García Quiñones

Laboratorio de Biotecnología de las Plantas, Universidad de Pinar del Río

RESUMEN

La micropropagación de *Psidium salutare* se logró a partir del cultivo de explantes nodales, en el medio Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP) solo o en combinación con ácido indol 3-acético (AIA). La mejor tasa de multiplicación se obtuvo en presencia de BAP 1.0 mg/L y AIA 0.1 mg/L con un promedio de 4 - 6 brotes por explante después de seis semanas en cultivo. El enraizamiento se logró cultivando los brotes por separado en el medio Lloyd Mc Cown (1981) (WPM) a la mitad de la concentración de las sales, sacarosa 1.5%, carbón activado 1 g/L y ácido naphthalenacético (ANA) 0.2 mg/L solo o en combinación con ácido indolbutírico (AIB) 0.2 mg/L. Las plantas regeneradas "in vitro" fueron adaptadas en suelo lográndose un 75% de sobrevivencia.

Palabras clave: *Psidium salutare*, Myrtaceae, cultivo *in vitro*, micropropagación

ABSTRACT

The micropropagation of *Psidium salutare* was achieved by culturing nodals explants in MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) alone or in combination with indol 3-acetic acid (AIA). Multiples shoots were induced, achieving the best rate of multiplication with BAP 1.0 mg/L and AIA 0.1mg/L. In this medium 4-8 shoot developed for explants after 6 weeks of culturing. The rooting occurred subculturing the excised shoot in medium with ½ strength Lloyd Mc Cown (1981) (WPM) salts, sucrose 1.5%, activated charcoal 1g/L., naphthalenacetic acid (ANA) 0.2 mg/L alone or combination with indolbutyric acid (AIB) 0.2 mg/L. Regenerated plants were successfully established on soil obtaining a 75% of survival.

Key words: *Psidium salutare*, Myrtaceae, *in vitro* culture, micropropagation

INTRODUCCIÓN

Psidium salutare (Kunth) Berg, (Berg, 1856, citado por McVaugh, 1963). se reconoce con los nombres comunes de: guayabita del pinar (Cuba), guayabito (Costa Rica), guayabito, arrayán, guayabito del Perú (Panamá).

En Cuba se encuentra en Pinar del Río e Isla de la Juventud. Hace 50 años esta especie ocupaba las sabanas y localidades abiertas en áreas de pinares, en la actualidad la mayoría de sus biótotos están modificados, quedando desplazada a lugares poco accesibles, sus poblaciones se han reducido, encontrándose fundamentalmente individuos aislados aparentemente muy envejecidos que en la mayoría de los casos no mantienen un buen desarrollo, además la regeneración natural es prácticamente nula (Sotolongo 1999).

La conservación de esta especie constituye una tarea de gran importancia para Pinar del Río, ya que sus frutos son la materia prima para la elaboración del licor "Guayabita del Pinar", uno de los símbolos que distinguen a esta provincia nacional e internacionalmente.

Los trabajos llevados a cabo para su recuperación han estado limitados por las serias dificultades que presenta la especie para su reproducción debido a que la capacidad germinativa de sus semillas es extremadamente baja y la propagación vegetativa por métodos convencionales no ha sido posible hasta el presente.

La aplicación del cultivo de tejidos, que a su vez comprende a la micropropagación ha sido una técnica muy difundida y con muchas aplicaciones prácticas comprobadas, por lo que puede contribuir a solucionar esta problemática.

Texeira & al. (1995) señalan que la conservación genética de árboles nativos requiere el estudio de la propagación sexual y asexual, incluyendo la factibilidad del uso de las técnicas de micropropagación lo cual en muchos casos resulta ser la única vía para la propagación vegetativa y conservación de germoplasma.

En la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas y más recientemente en especies leñosas Roca & Mrogrinski, 1993). En algunas especies el propio autor señala que esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales.

La propagación de plantas leñosas a través del cultivo de tejidos ha sido lograda en varias especies de frutales y forestales cultivadas con el fin de multiplicar genotipos de interés. En la actualidad el cultivo *in vitro* es utilizado cada vez más para la propagación de especies amenazadas con el fin de aumentar rápidamente el número de individuos, superar problemas de fertilidad y de biología reproductiva, así como proporcionar material para su reintroducción en la naturaleza y contribuir a la conservación de la diversidad a mediano y largo plazo.

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer una metodología para la micropropagación de la especie que incluyó desde el establecimiento del cultivo aséptico hasta la fase post *in vitro* o de adaptación al suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los explantes utilizados fueron segmentos nodales, obtenidos a partir de rebrotes emitidos de ramas leñosas colectadas en las poblaciones naturales de la especie y colocadas en agua.

Teniendo en cuenta la alta susceptibilidad a la fenolización de los explantes durante el establecimiento del cultivo aséptico se combinaron, la desinfección superficial y el control de la oxidación fenólica, para lo cual se llevó a cabo el siguiente procedimiento (Sotolongo, 1998).

- Tratamiento a las ramas, desde la colecta, y a los rebrotes con solución de oxiclورو de cobre 1% cada dos días.
- Colecta de los rebrotes en solución de cisteína 25 mg/L.
- Seccionado de los rebrotes en segmentos nodales.
- Desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% de cloro activo durante 10 minutos.
- Inmersión en solución de sacarosa al 2% + polivinilpirrolidona (PVP) 2 g/L durante 1 hora.
- En el flujo laminar, desinfección con solución de bicloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,05% durante 4 minutos.
- Cinco enjuagues con solución estéril de cisteína 25 mg/L .
- Inmersión en solución estéril de sacarosa al 2% + PVP 2 g/L durante 1 hora.

Para el establecimiento e inducción de la brotación fue utilizado el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con vitaminas de Gamborg (Gamborg, 1984) y sacarosa 3%. En estos se probó el efecto de la cisteína y el PVP como antioxidantes en diferentes concentraciones, así como varios niveles de BAP (6 bencilaminopurina) 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,6 y 1,0 mg/L. El pH fue ajustado a 5,7. Como agente solidificante fue utilizado Agar Tipo E 5 g/L.

Para la multiplicación los segmentos nodales inducidos en la etapa anterior fueron cultivados en medios constituidos por las sales del medio MS, suplementado con vitaminas de Gamborg, 3% de sacarosa y cisteína 25 mg/L, pH 5,7, solidificado con agar tipo E al 4% p/v.

Para definir el balance hormonal más adecuado para esta fase se estableció un diseño con tres niveles de BAP y cuatro niveles de AIA (ácido indol 3-acético) (Tabla I), evaluándose a las 6 semanas: número de brotes por explante y la longitud de los brotes (mm).

TABLA I

Combinación de reguladores del crecimiento empleados en la multiplicación a partir de segmentos nodales de *Psidium salutare*.

VARIANTES mg/L ⁻¹	AIA				
	0	0.1	0.3	0.5	
BAP	1	A	D	E	F
	1.5	B	G	H	I
	2	C	J	K	L

En la fase de enraizamiento los brotes se individualizaron y fueron cultivados en tubos de ensayos con soporte de papel o en frascos sobre medio sólido. Se utilizó como medio base el WPM (Lloyd & Mc Cown, 1981) a la mitad de la concentración de las sales complementado con vitaminas de Gamborg, sacarosa 1,5% y cisteína 25 mg/L. Para la inducción rizogénica se probaron las auxinas AIA, AIB (ácido indolbutírico), ANA (ácido naphthalenacético) y 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) a diferentes concentraciones (Tabla II).

TABLA II

Combinación de reguladores del crecimiento empleados en el enraizamiento de brotes obtenidos *in vitro* de *Psidium salutare*.

Auxina	Concentración mg/L						
Testigo	Sin auxina						
AIA	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	1,0
AIB	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1,0	
ANA	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1,0	
2,4 D	0,1	0,2	0,3	1,0			
AIB + ANA	0,1 + 0,1		0,2 + 0,2				

En cada una de las variantes se probó la adición o no de carbón activado 1%, y el pH fue ajustado a 5,7.

El experimento fue evaluado a través de la determinación del porcentaje de brotes enraizados en cada variante hormonal a las seis semanas de cultivo.

Análisis biométrico: se utilizó un diseño completamente al azar con análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan para $p < 0,05$, a través del paquete estadístico Statistical Package for Social Science para Windows, versión 8 de 1998 (SSPS). Los resultados en % de enraizamiento fueron transformados a valores de raíz cuadrado.

Los medios de cultivo fueron distribuidos en tubos de ensayo con capacidad de 60 mL (15 mL/tubo) o en frascos con capacidad de 200 mL (25 ml/frasco) la esterilización se llevó a cabo en autoclave, durante 15 minutos a 120°C de temperatura y 1,5 atmósferas de presión.

Los cultivos se mantuvieron en cámaras con temperaturas entre 23-27 °C con un fotoperíodo de 16 horas luz y una intensidad luminosa entre 42 – 56 mmol/s. m² obtenida de lámparas fluorescentes.

Las plántulas enraizadas de *Psidium salutare* fueron aclimatadas en condiciones de umbráculo (malla plástica 70% de sombreo) y se procedió conforme a la siguiente secuencia de etapas:

1. Retirada de las plántulas de los frascos y lavado de las raíces con agua corriente.
2. Transferencia de las plántulas a bolsas con un sustrato constituido por una mezcla de suelo y materia orgánica.
3. Cobertura de las plantas con nylon transparente por cuatro semanas.
4. Retirada gradual del cobertor de nylon durante una semana.
5. Después de cuatro semanas de retirado el nylon, las plantas fueron trasladadas al vivero.

La fase de aclimatación se evaluó teniendo en cuenta el porcentaje de sobrevivencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento *in vitro*

El elemento que más influye, negativamente, durante el establecimiento de los explantes de *Psidium salutare* es la fenolización por lo que se hizo especial énfasis en su control, tanto durante el proceso de desinfección como de cultivo *in vitro*.

La combinación de los tratamientos con fungicida (oxicloruro de cobre 1% cada dos días), la doble desinfección superficial, primero con NaOCl y después con HgCl₂ y la aplicación de antioxidantes permitió el establecimiento *in vitro* del 66% de los explantes. El resto, 10% se perdió por contaminación y 24% por fenolización.

La oxidación fenólica, aparece como consecuencia de los cortes durante la preparación de los explantes y de la acción de los desinfectantes sobre el tejido dañado, lo que constituye un serio problema para la supervivencia de meristemos y ápices sobre todo de especies leñosas. Estos compuestos oxidados son altamente reactivos y fitotóxicos (Hu & Wang, 1983), lo cual resulta letal para los explantes.

Los mejores resultados se obtuvieron en los medios donde fue adicionada cisteína 25 mg/L, el efecto antioxidante de este compuesto fue independiente a la concentración utilizada. Resultado similar reporta Santana & Gonzáles, (1988) para el establecimiento de explantes foliares de *Coffea arabica*.

El efecto del PVP en los medio de cultivo no tuvo una acción significativa en el control de la fenolización de los explantes de *Psidium salutare*. Resultados similares obtuvieron Puchooa & al.,(1998) en el establecimiento de explantes de *Trochetia boutoniana*. Por su parte Guevara & al., (1992) obtienen los resultados más bajos de establecimiento de explantes de *Cedrela tonduzii* al usar PVP 7 g/L en el medio de cultivo.

Fue posible la inducción de la brotación en un 20 por ciento de los explantes inoculados inicialmente, lo cual representó el 60 por ciento del total de los explantes establecidos (Tabla III). La brotación solo ocurrió en presencia de BAP obteniéndose entre 1 y 2 brotes por explante que alcanzan su mayor desarrollo entre las seis y ocho semanas de iniciado el cultivo.

Como se observa en la mencionada tabla III, se pudo inducir la brotación solamente en un rango entre 0.1 y 0.3 mg/L de BAP, a diferencia de otras especies como *Didymopanax morototoni*, donde se logra la estimulación de la brotación con concentraciones de BAP que van desde 0,01 hasta 10 mg/L (Mantovani, 1997). En el caso de *Psidium salutare* concentraciones de esta citoquinina superiores a 0,3 mg/L indujeron la formación de callo en la zona de abscisión de la hoja lo que impidió el desarrollo del brote.

TABLA III

Explantes de *Psidium salutare* (%) que emitieron brotes durante el establecimiento en medios con diferentes concentraciones de BAP.

Concentración de BAP (mg/L)	Segmentos Nodales con Brotes (%)
0	0
0,1	12
0,2	80
0,3	7
0,6	Formación de callo
1,0	Formación de callo

Multiplicación

La multiplicación se llevó a cabo con segmentos nodales obtenidos durante la etapa anterior. Se comprobó que, para concentraciones de BAP menores a 1 mg/L la tasa de multiplicación se comporta muy baja pues fue inferior a tres brotes por explante; por otra parte una concentración de BAP superior a 2 mg/L provoca la formación de callo sobre todo el explante.

La formación de nuevos brotes se indujo en todas las combinaciones hormonales probadas, el análisis de varianza multifactorial reveló significación estadística para los efectos de las concentraciones de BAP y AIA analizados, así como para la interacción de estos dos

factores sobre el número y la longitud de los brotes formados.

En la figura 1 los tratamientos donde se combinó el BAP y el AIA el número de brotes inducidos fue significativamente superior a las variantes donde sólo se adicionó BAP al medio de cultivo (variantes A, B, y C). La mejor tasa de multiplicación se logró en la variante D.

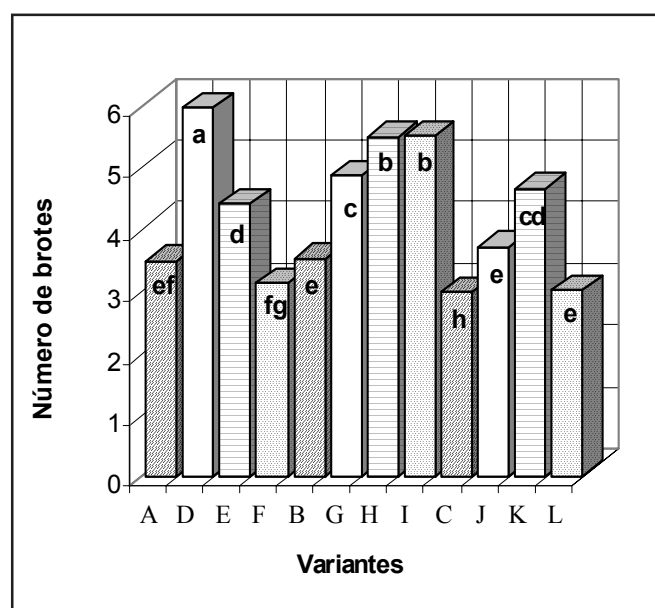


Fig. 1. Aspecto de los rebrotes emitidos en ramas leñosas colocadas en agua y que fueron posteriormente utilizados como explantes para el cultivo *in vitro* *Psidium salutare*.

Muchos autores señalan que la combinación de ambos tipos de hormonas (citoquininas y auxinas) son necesarias para inducir un mayor número de brotes, Ajithkumar & Seenii (1998) concluyeron que la propagación clonal *in vitro* de *Aegle marmelos* solo fue posible cuando se combinó BAP y AIA, induciendo la brotación con un balance de 2,5 mg/L + 1,0 mg/L respectivamente.

El balance y la concentración hormonal también ejercieron un efecto significativo sobre el crecimiento de los brotes, como se puede observar en la figura 2, las variantes donde estos alcanzan una mayor longitud son las que contienen AIA, por lo que se puede plantear que la presencia de esta auxina tuvo un efecto estimulante sobre el desarrollo de los brotes. En la variante D nuevamente se logran los mejores resultados en cuanto a este parámetro.

Al respecto Debergh & Read (1991) señalan que el alargamiento de los brotes y la reducción de los efectos residuales de las citoquininas, pueden ser rebasados con la utilización de reguladores del crecimiento del grupo de las giberelinas y las auxinas así como, con la adición al medio de cultivo de carbón activado.

Se determinó que el tiempo óptimo entre subcultivos fue de seis semanas, en este período los brotes neoformados alcanzaron el mayor desarrollo posible, a partir de la sexta semana debido al agotamiento de los nutrientes del medio estos comienzan a marchitarse.

Enraizamiento

Todas las auxinas probadas tuvieron un efecto rizogénico en un determinado rango de concentración, por encima del cual apareció la formación de callo basal y raíces deformadas (Tabla IV).

Los mejores resultados correspondieron a los tratamientos donde se empleó AIB 0,2 mg/L + ANA 0,2 mg/L, ANA 0,2 mg/L, y 2,4 D 0,1 mg/L y los valores más bajos de inducción se produjeron en los tratamientos que contenían AIA y AIB. El mejor resultado al combinar ANA y AIB debe estar relacionado con el efecto sinérgico sobre la morfogénesis de raíces al actuar simultáneamente ambas auxinas.

Se pudo comprobar también que en los medios donde no se adicionó carbón activado apareció la formación de callo basal, cualquiera fuera la concentración de auxina empleada. Al respecto Krikorian (1995) señala que la adición de carbón activado al medio absorbe los excesos de hormonas y otros compuestos, lo que impide la formación de callo y favorece el enraizamiento.

Con el empleo de las sales minerales del WPM a la mitad de la concentración se logró un buen enraizamiento y desarrollo de los brotes de *Psidium salutare*. La consistencia del medio de cultivo no tuvo influencia sobre la rizogénesis aunque en este caso es preferible el medio en estado líquido, pues se ahorra agar que encarece los costos por concepto de medios de cultivo en un 90% (Pérez Ponce & al., 1999), además la raíz se daña menos al ser extraída del tubo y llevada a la bolsa para su aclimatación.

Aclimatación

El uso del cobertor de polietileno transparente y la aplicación de riegos con microaspersores cada dos horas durante el período diurno permitió mantener una elevada humedad relativa así como una reducción de la iluminación, lo que llevó a que se lograra un 75% de sobrevivencia durante esta fase.

Las características fisiológicas, estructurales y anatómicas que las plántulas presentan producto del desarrollo *in vitro* hacen muy complejo el proceso de adaptación o aclimatación, sobre todo de especies leñosas, por lo que el control estricto de las condiciones ambientales durante esta fase fue determinante en el proceso de la micropropagación de *Psidium salutare*.

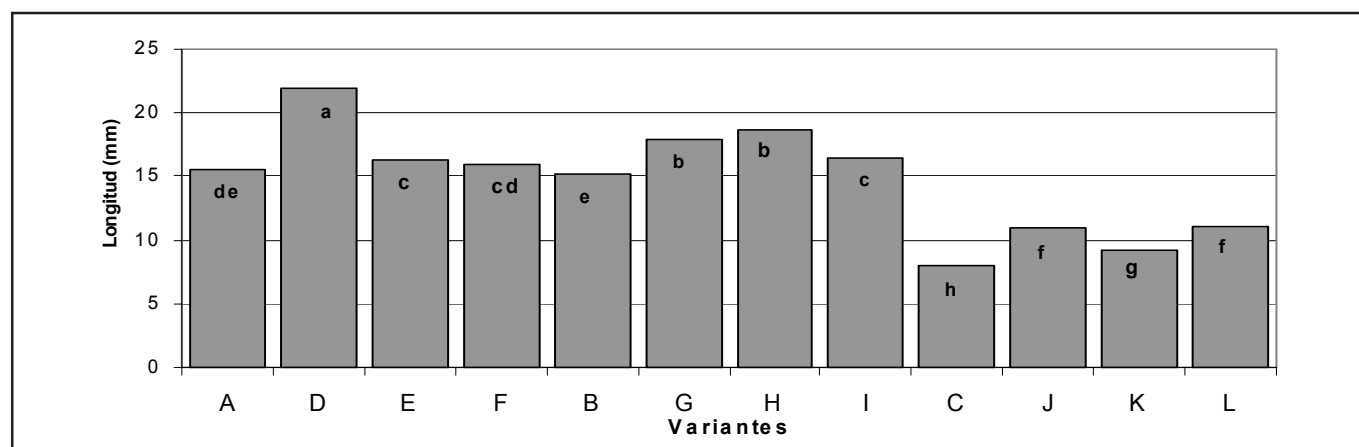


Fig. 2. Comparación de la longitud promedio alcanzada por los brotes en cada variante hormonal durante la fase de multiplicación a las seis semanas de cultivo. (Letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$)

TABLA IV

Efecto de las diferentes concentraciones de auxinas sobre el enraizamiento de brotes (%). (Letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$).

	mg/L	Media Valores Transformados	Error estandar	% Enraizamiento Valores Retransformados
AIA	0.1	5,96 e	,007	35,53
	0.2	7,21 c	,007	51,99
	0.3	8,08 b	,161	65,28
	0.4	7,83 bc	,118	61,30
	0.5	7,82 bc	,046	61,16
	0.6	5,91 e	,098	34,98
Concentración superior, formación de callo basal				
AIB	0.1	6,89 cd	,021	47,49
	0.2	7,30 c	,099	53,31
	0.3	7,85 bc	,042	61,66
	0.4	7,12 c	,084	50,65
Concentración superior, formación de callo basal				
ANA	0.1	8,46 b	,073	71,55
	0.2	9,29 a	,078	86,28
	0.3	7,48 c	,102	55,97
	0.4	7,59 c	,058	57,65
Concentración superior, formación de callo basal				
2-4 D	0.1	9,23 ab	,024	85,16
	0.2	8,14 b	,041	66,32
	0.3	6,63 d	,116	43,97
Concentración superior, formación de callo basal				
AIB+ANA	0.1+0.1	8,60 b	,058	73,99
	0.2+0.2	9,50 a	,018	90,33

BIBLIOGRAFÍA

Ajithkumar D & Seeni S. 1998. Rapid clonal multiplication through *in vitro* axillary shoot proliferation of *Aegle marmelos* (L) Corr, a medicinal tree. *Plant Cell Reports*. 17(5): 422- 426.

Debergh PC & Read PE. 1991. Micropropagation. En: *Micropropagation: Technology and Application*. (Ed.) Kluwer Academic Dordrecht. p. 1 – 13.

Gamborg OL. 1984. Plant cell culture: Nutrition and media. En: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant*, Vol. I, (Ed.) San Francisco. California. p. 18 - 26.

Guevara E, Hidalgo N & Murillo O. 1992. Cultivo *in vitro* de Cedro dulce (*Cedrela tonduzii*). *Tecnología en Marcha*. 11 (3): 10 – 16.

Hu CV & Wang J. 1983. Meristem shoot tip and bud culture. En: *Handbook of Plant Cell*. (Eds) Evans, D. A.; P. V. Ammirato and Y. Yameda p. 256 – 290.

Krikorian AD. 1995. Hormones in Tissue culture and Micropropagation. En: *Plant hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. (Ed.) Peter J. Davis. p. 774 – 796.

Lloyd G & McCown B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalma latifolia*, by use of shoot tip culture. *Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30: 327 – 421.

Mantovani NC. 1997. Estudio de regeneración *in vitro* de caixeta (*Didymopanax morototoni*). *Dissertação de Mestrado*.

McVaugh R. 1963. Flora de Guatemala. *Fieldiana: Botany*. Parte VII. 24 (3): 399 – 400.

Murashige T & Skoog F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473 – 497.

Pérez Ponce JN, Jiménez F & Agramonte D. 1999. Aclimatación (Fase IV). Características y problemáticas. En: *Biología Vegetal, Libro de Reportes Cortos. 5^o Coloquio Internacional de Biología Vegetal*. (Ed.) Pérez Ponce, J. N. Instituto de Biología de las Plantas Santa Clara. Cuba. p. 188 - 189.

Puchooa D, Sooben GN & Linddey K. 1998. *In vitro* culture of *Trochetia boutoniana*. *Botanic Gardens Micropropagation News*. 2 (3): 41 – 43.

Roca WM & Mrogrinski LA. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura. *Fundamentos y aplicaciones*. CIAT. Cali. Colombia. p. 127 - 141

Santana Nancy, Martínez O & González María. 1988. Embriogénesis somática en el cultivo del café (*Coffea arabica*). (Parte I). *Cultivos tropicales*. 10 (2): 36 – 43.

Sotolongo R. 1998. Aplicación del cultivo de tejidos a la recuperación de *Psidium salutare* Kunth Berg. *Tesis de Maestría*.

Teixeira JB, Lemos JI & Coelhe MC. 1995. Micropropagação de espécies lenhosas da mata atlântica. En: *Congreso brasileiro de Fisiologia Vegetal*, 5. (Ed.) Lavras. Anais. p. 132.

Recibido: 15 de noviembre del 2002.

Dirección de los autores: Laboratorio de Biología de las Plantas. Universidad de Pinar del Río, Carretera a San Juan y Martínez Km 5. CP 20300, Pinar del Río, Cuba.

Revista del
**Jardín Botánico
Nacional**

El Comité Editorial de la Revista del Jardín Botánico Nacional y la Dirección de la Institución, agradecen la desinteresada colaboración y la rapidez en la revisión de trabajos correspondientes al Vol. XXIV, No. 1-2, (2003) a los siguientes especialistas:

Dra. Rosa Rankin Rodríguez
Dra. Rosalina Berazaín Iturralde
Dr. Víctor R. Fuentes Fiallo
Dra. Lutgarda González Geigel

Dra. Esther Diosdado Salces
Dr. Alberto Álvarez de Zayas
Dra. Alicia Rodríguez Fuentes