

Micropropagación y regeneración de plantas *in vitro* de oreganillo *Lippia micromera* Schau. in DC. var. *helleri* (Britt.) Mold.

Amelia Capote, Víctor Fuentes, Nilda Blanco y Odalys Pérez

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT)

RESUMEN

Se propone una metodología para la multiplicación, la obtención de callos morfogénicos y la regeneración *in vitro* de plantas de *Lippia micromera* Schau. in DC.: var. *helleri* (Britt.) Mold. (Verbenaceae), utilizando como explantes yemas apicales y segmentos nodales de brotes jóvenes de plantas crecidas en condiciones de campo. Una eficiente tasa de multiplicación fue obtenida al emplear medio MS suplementado con 0,1 mg/L ANA y 2 mg/L BAP. La obtención de callos altamente morfogénicos en medio MS con la adición de 0,5 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP permitió obtener una eficiente regeneración de plantas. Este método posibilita la propagación *in vitro* de esta especie utilizada como condimento, cuya propagación por métodos tradicionales resulta lenta y difícil.

Palabras clave: *Lippia micromera*, Verbenaceae, multiplicación *in vitro*.

ABSTRACT

A methodology for *in vitro* multiplication, obtainment of morphogenic calluses, and regeneration of *Lippia micromera* Schau. in DC. var. *helleri* (Britt.) Mold. (Verbenaceae), by using -as explants- apical buds and nodal segments of young shoots from plants grown under field conditions, is proposed. An efficient rate of multiplication was obtained when MS medium was enriched by adding 0,1 mg/L of NAA and 2 mg/L of BAP. Highly morphogenic calluses obtainment in MS medium by adding 0,5 mg/L of NAA and 2 mg/L of BAP, led to an efficient regeneration of plants. This method makes possible the *in vitro* propagation of this species widely used as a condiment, whose propagation by traditional methods is slow and difficult.

Key words: *Lippia micromera*, Verbenaceae, *in vitro* multiplication.

INTRODUCCIÓN

Lippia micromera Schau. in DC. var. *helleri* (Britt.) Mold., comúnmente conocida en Cuba como oreganillo, es propia de las costas y pequeñas elevaciones de las provincias orientales donde se puede encontrar escasamente, y con cierta frecuencia cultivada en patios y jardines en todo el país, principalmente en las regiones orientales.

En Cuba esta especie se emplea únicamente como condimento (Esquivel *et al.*, 1992; Fuentes y López, 1994) en sustitución del orégano (*Origanum vulgare*L.) al que supera ampliamente en aroma, aunque por su agradable porte puede constituir un buen ornamental; en otros países se emplea como planta medicinal (Ayensu, 1981). Esta especie se multiplica asexualmente a partir de estacas de tallo; sin embargo, los porcentajes de enraizamiento y sobrevivencia son muy bajos.

Actualmente existe una gran demanda de especies condimenticias en el mercado interno, por lo que es de gran importancia desarrollar técnicas que aceleren la reproducción de estos cultivos. Las técnicas de cultivo *in vitro* han sido ampliamente utilizadas en muchas especies con la finalidad de proveer una vía de propagación que facilite la multiplicación y el mantenimiento de genotipos de interés.

Es por ello que el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar una técnica sencilla y eficiente para la propagación acelerada que permita la obtención y propagación *in vitro* de plantas de oreganillo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron brotes jóvenes de plantas adultas crecidas en condiciones naturales y que no mostraban síntomas de presencia de enfermedades, los cuales fueron lavados con detergente comercial y se enjuagaron con agua corriente varias veces. La desinfección se realizó sumergiéndolos en una solución de lejía comercial (50 g/L de cloro activo) al 2 % durante 15 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces.

Una vez desinfectados y en condiciones asépticas se seccionaron las yemas apicales y los segmentos nodales para ser utilizados como explantes.

Los explantes se cultivaron en el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g/L de sacarosa y la adición de 0,1 y 0,5 mg/L de ácido indol acético (AIA) y 2 mg/L de 6-bencil amino purina (BAP). Se persiguieron dos objetivos diferentes: la propagación acelerada de vitroplantas y la obtención de plantas a par-

tir de callos vía organogénesis.

Los callos obtenidos se seccionaron en pequeños segmentos y fueron subcultivados en el medio MS con la adición de 2mg/L de BAP y 10 % de agua de coco para inducir la regeneración y el desarrollo de plantas a partir de los callos.

Los brotes obtenidos fueron enraizados en el mismo medio MS sin suplemento hormonal.

En todos los casos el pH de los medios fue ajustado a 5,8 antes de añadir el agar (7 g/L) y esterilizados en autoclave a 121 °C y 1,2 atm de presión.

Los cultivos se mantuvieron en un fotoperíodo de 14 horas luz y a una temperatura de (25 ± 2) °C, realizándose los subcultivos cada 30 días al mismo medio de cultivo. Se evaluó la tasa de multiplicación en función del número de segmentos nodales obtenidos por planta y su variación en dependencia del número de subcultivos realizados.

Las plántulas obtenidas *in vitro* fueron lavadas cuidadosamente para eliminar todos los residuos de agar que pueden ser una fuente de contaminación, quedando en condiciones de ser transferidas para la fase de adaptación.

Para su adaptación a las condiciones *ex vitro*, éstas fueron plantadas en cepellones (40 alvéolos 5 x 5 cm), empleando como sustrato una mezcla de suelo (Ferralítico Rojo) y materia orgánica (1:1). A los 15 días de transferidas se evaluó el porcentaje de sobrevivencia en estas condiciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En ambos explantes (yemas apicales y segmentos nodales) empleados fue posible la implantación de los explantes libre de microorganismos, dada por la efectividad del tratamiento de desinfección realizado.

Ambos tipos de explantes desarrollaron brotes en el medio MS suplementado con 0,1 mg/L de AIA y 2 mg/L de BAP (Fig. 1). Los resultados a los 30 días de cultivo indican que la tasa de multiplicación osciló en un promedio de 8 a 10 segmentos nodales/ brote obtenido.

En el caso de los segmentos nodales debido a la presencia de hojas opuestas en este cultivo se obtuvo el desarrollo de ambas yemas axilares, lo que dio como resultado un incremento considerable de la tasa de multiplicación a partir de un explante inicial, si se tiene en cuenta que en el 83 % de los explantes se desarrollaron ambas yemas axilares.

Bajo las condiciones ya descritas, se evaluó la tasa de



Fig.1. Desarrollo de brotes axilares a partir de segmentos nodales de *Lippia micromera* cultivados en medio MS suplementado con 0,1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP.

multiplicación en sucesivos subcultivos (6) realizados cada 30 días, sin presentarse diferencias entre los valores obtenidos ni brotes con características negativas como la vitrificación o pérdida del vigor, lo cual posibilita la obtención de un gran número de plantas a partir de un explante inicial.

La multiplicación de *Lippia micromera* fue reportada a partir de segmentos nodales en un medio que contenía las sales de MS con la adición de 0,1 mg/L de AIA y 1 mg/L de BAP por García *et al.* (1997), aunque no se especifica la tasa de multiplicación obtenida bajo estas condiciones.

No se ha encontrado otro trabajo en la literatura revisada, aparte del anteriormente citado, que reporte la multiplicación *in vitro* de cultivares en esta especie ni en otras del mismo género.

Al utilizar una concentración mayor de auxinas en el medio de cultivo (0,5 mg/L de AIA) se obtuvo al mes aproximadamente una gran proliferación de callos de color pardo oscuro y consistencia friable que resultaron altamente morfogénicos, lográndose la inducción de alrededor de 10 a 15 brotes/ callo, tanto en la parte superior del mismo como en las capas que se mantienen en contacto con el medio de cultivo (Fig. 2).



Fig. 2. Proliferación de brotes en callos morfológicos en medio MS con la adición de 0,5 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP.

En los callos obtenidos en estas condiciones, al ser subcultivados al medio de cultivo suplementado con BAP y agua de coco, se estimuló el desarrollo de nuevos brotes y el crecimiento de los mismos.

Los brotes regenerados a partir de los callos pueden pasar a medio de enraizamiento o son susceptibles de micropropagarse si son subcultivados al medio de cultivo donde se desarrollan los brotes axilares.

En el medio de enraizamiento estudiado (MS sin suministro hormonal) los brotes obtenidos desarrollaron un sistema radical adecuado, alcanzando el tamaño y vigor requerido para ser trasplantadas para su adaptación a condiciones *ex vitro* (Fig. 3). Se ha planteado con anterioridad que en algunas especies la eliminación de las citocininas exógenas ha sido suficiente para la diferenciación del sistema radical (Thorpe, 1980).

Estos resultados difieren de los obtenidos por García *et*

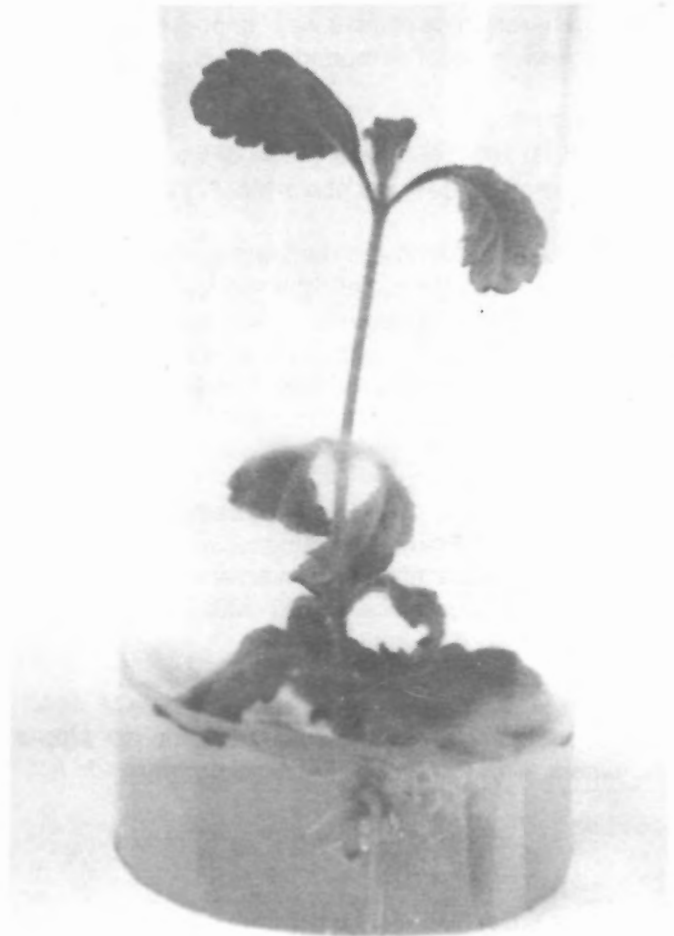


Fig. 3. Brote de *Lippia micromera* creciendo en medio de enraizamiento (MS sin suministro hormonal), listo para ser transferido a condiciones *ex vitro*.

al. (1997) quienes plantean que el medio más efectivo para el enraizamiento de los brotes fue el WPM (Lloyd y McCown, 1981) con 0,5 mg/L de ácido naftalén acético (ANA) líquido con un soporte de papel.

En la adaptación de las vitroplantas se alcanzaron altos porcentajes de sobrevivencia bajo las condiciones estudiadas (86,4 %) y las plantas obtenidas mantuvieron las características fenotípicas similares a la planta madre, lo cual garantiza la eficiencia de esta técnica en la multiplicación *in vitro* de esta especie.

CONCLUSIONES

Estos resultados permiten la propagación *in vitro* de *Lippia micromera* empleando diferentes estrategias:

- La micropropagación a partir de yemas apicales y segmentos nodales de brotes jóvenes de plantas crecidas en condiciones naturales.

- La regeneración de plantas vía organogénesis a partir de la obtención de callos morfogénéticos.

BIBLIOGRAFÍA

Ayensu E S. 1981. Medicinal plants of the West Indies. Michigan. Reference Publications Inc, Algonac. 282 pp.

Esquivel M, Knupffer K and Hammer K. 1992. Inventory of the Cultivated Plants. En: Hammer KF, Esquivel M und Knupffer H. "... y tienen faxones y fabas muy diversos de los nuestros...". Origin, Evolution and Diversity of Cuban Plant Genetic Resources. Vol. 2. Gatersleben. Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, 213- 454.

Fuentes V y López L. 1994. Apuntes para la flora económica de Cuba. II. Plantas condimenticias. En: Resúmenes VII Jornada Científica 90 Aniversario de la Estación Experimental Agronómica. INIFAT- MINAGRI. Santiago de las Vegas, 4 - 8 de abril de 1994.

García M, Aguilar JR, Betancourt M y Medina M. 1997. Multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Lippia micromera*. En: Resúmenes Técnicas de Avanzada Apli-

cadash a la Propagación Masiva de Plantas. Ciego de Ávila, Cuba, 2 - 5 de abril, p. 5.

Lloyd G and McCown B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. International Plant Propagator Soc. Combined. Proceedings of Annual Meetings. 30: 421- 427.

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

Thorpe TA. 1980. Organogenesis *in vitro*: Structural, physiological and biochemical aspect. En: International Review of Cytology, Supplement 11A. Nueva York Academic Press, 71-111.

Recibido: 15 de septiembre de 1998.

Direcc. de los autores: Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), Calle 1 esq. 2, Santiago de las Vegas, Boyeros. CP. 17200, Ciudad de La Habana, Cuba.