

Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Podocarpus oleifolius* D. Don

Mireya Galárraga¹, Jaime Hidrobo^{2*}, Norman Soria¹, Jaime Gía¹ *Autor para correspondencia

¹Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). Av. General Enríquez, Sangolquí, Pichincha, Ecuador.

²Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Central del Ecuador. Ciudadela Universitaria, Quito, Pichincha, Ecuador. e-mail: hidroboluna@yahoo.es

RESUMEN

El romerillo (*Podocarpus oleifolius* D. Don), es la única conífera endémica de Ecuador y está considerada en peligro de extinción. El objetivo de esta investigación fue establecer y multiplicar *in vitro* *P. oleifolius* vía organogénesis directa a partir de segmentos apicales de árboles jóvenes cultivados en campo. Para la desinfección se estudiaron cuatro concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) (1.0, 1.25, 1.5 y 1.75%) por 10 min y luego etanol al 70% durante 30 s. A las cuatro semanas de cultivo, se cuantificó el número de explantes necrosados, contaminados, viables (supervivencia) y con mortalidad. Además, se determinó el efecto de la concentración de sales MS (50 y 100%) y Bencil Amino Purina (BAP) (0.5 y 1.0 mg l⁻¹). A las cuatro semanas de cultivo se midió la longitud de la yema apical (cm) y se cuantificó el número de yemas brotadas. Para multiplicar *in vitro* los brotes de romerillo obtenidos, se añadieron al medio de cultivo diferentes concentraciones de BAP y Ácido Indol Butírico (AIB). Se cuantificó el número de brotes formados por explante y se midió la longitud de la yema apical (cm) en tres subcultivos. Con NaOCl al 1.25% se obtuvo el más alto porcentaje de explantes viables con porcentajes bajos de contaminación microbiana y explantes necrosados. El mayor porcentaje de yemas brotadas se obtuvo en los explantes cultivados en los medios de cultivo sin BAP y los valores más altos de longitud de la yema apical en el medio de cultivo MS. Se logró la multiplicación *in vitro* de *P. oleifolius*. Sin embargo, los reguladores del crecimiento BAP y AIB a las concentraciones probadas no aumentaron el número de brotes por explante. Este trabajo sirve como pauta para la implementación de un sistema de propagación a gran escala de esta especie vegetal.

Palabras clave: brotes, cultivo de tejidos, reguladores del crecimiento, viabilidad, yema apical

In vitro establishment and multiplication of *Podocarpus oleifolius* D. Don

ABSTRACT

Romerillo (*Podocarpus oleifolius* D. Don) is the only endemic conifer of Ecuador and is considered endangered. The objective of this research was to establish and to *in vitro* multiply of *P. oleifolius* via direct organogenesis from apical segments of young trees grown in field. For disinfection, four concentrations of sodium hypochlorite (NaOCl) (1.0, 1.25, 1.5 and 1.75%) for 10 min and then 70% ethanol for 30 s were studied. At four weeks of culture, the number of necrotic explants contaminated, viable (survival) and mortality was quantified. Furthermore, the effect of the MS salts concentration (50 and 100%) and Benzyl amino purine (BAP) (0.5 and 1.0 mg l⁻¹) was determined. At four weeks of culture the apical bud length (cm) was measured and the number of sprouted buds was quantified. To *in vitro* multiply obtained romerillo sprouts, it was added different concentrations of BAP and Indol Butyric Acid (IBA) to the culture medium. The number of shoots formed per explant was quantified and the length of the apical bud (cm) was measured in three subcultures. With 1.25% NaOCl the highest percentage of viable explants with low percentages of microbial contamination and necrotic explants was obtained. The higher percentage of sprouted buds was obtained in explants grown in culture media without BAP and the highest values of the apical bud length in MS medium. *In vitro* multiplication of *P. oleifolius* it was achieved. However, growth regulators BAP and AIB at concentrations tested did not increase the number of shoots per explant. This work serves as a guideline for the implementation of a system for large-scale propagation of this plant species.

Key words: apical bud, plant tissue culture, plant growth regulators, shoots, viability

INTRODUCCIÓN

La tasa de deforestación existente en Ecuador, podría ser considerada como la más elevada del mundo, debido a los múltiples usos de sus recursos forestales por el hombre (Reporter, 2008). El romerillo (*Podocarpus oleifolius* D. Don), es la única conífera endémica de Ecuador (Lojan, 1992), apreciada debido a su importancia social y económica por la calidad de su madera. Además, es importante desde el punto de vista ambiental por ser fuente renovable y sustentable para la protección controlada de árboles y reforestación tanto en zonas rurales como en urbanas (Borja y Lasso, 1990).

El sistema radical de *P. oleifolius* está formado por un eje o pivote central de donde se ramifican las raíces secundarias. Su hábito de crecimiento no producen daños en las aceras y el asfalto urbano (Grez, 1998).

Las zonas urbanas de las grandes ciudades ecuatorianas están cultivadas con varias especies de pino (*Pinus silvestris* L.), que causan efectos negativos sobre el suelo (Cortés *et al.*, 1990). Por ello, existe la necesidad de su sustitución por *P. oleifolius* que provee al suelo una mejoría en sus propiedades físicas y químicas, disminuye la erosión y aumenta el valor ecológico de los ecosistemas naturales (Frank y Finckh, 2009).

Debido a problemas que posee *P. oleifolius* durante su conservación y reproducción (sexual) *in situ*, se considera como especie

amenazada de extinción (Jara y Ordoñez, 2000). Su propagación y establecimiento natural requiere de un período prologado de tiempo. El cultivo de tejidos, podría resultar una alternativa para la propagación masiva de esta especie debido a sus ventajas de alcanzar un alto número de plantas o propágulos de calidad, en cortos períodos de tiempo y en espacios reducidos (George *et al.*, 2008). Por ello, el objetivo de este estudio fue establecer y multiplicar *in vitro* *P. oleifolius* vía organogénesis directa a partir de segmentos apicales de árboles jóvenes cultivados en campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los bioensayos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Micropropagación de la Unidad de Espacio Público-Quito (UEP-Q), localizado en el Vivero Municipal de Cununyacu, vía intervalles km 2.5, parroquia Cumbayá, cantón Quito, provincia Pichincha, Ecuador.

Material vegetal

Para el establecimiento *in vitro* se emplearon segmentos apicales colectados de árboles jóvenes (aproximadamente 7 años) de *P. oleifolius*. Los árboles tenían una altura promedio de 1.5 m y se encontraban ubicados en el Vivero Municipal de la Armenia, perteneciente al Parque Metropolitano La Armenia, sector Valle de los Chillos y Tumbaco, cantón Quito, provincia Pichincha, Ecuador (Figura 1).

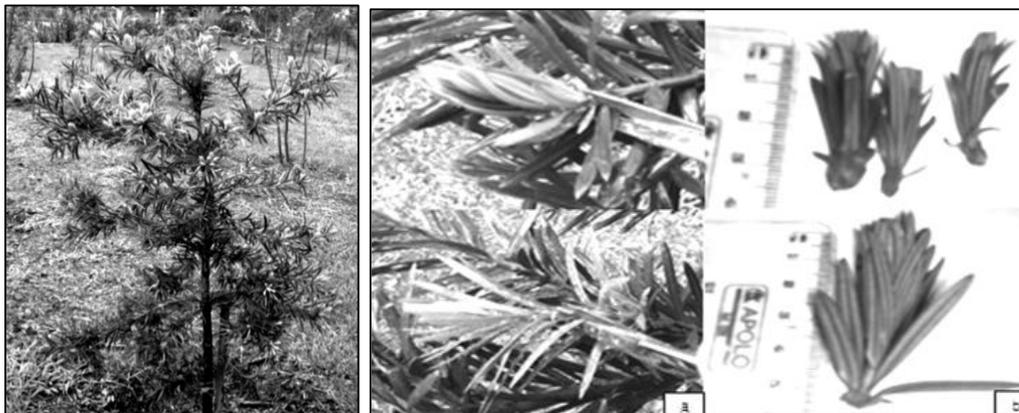


Figura 1. Material vegetal utilizado para el establecimiento *in vitro* de *Podocarpus oleifolius*. Izquierda: árboles jóvenes. Derecha: segmentos apicales antes de su establecimiento *in vitro*.

La recolección del material vegetal se llevó a cabo mediante colecta manual. Se realizaron cortes de segmentos apicales de 3-6 cm de longitud (Figura 1) que presentaban un denso follaje y varios brotes, poseían un color verde intenso, textura fina y homogénea.

Establecimiento *in vitro*

Desinfección

Para eliminar la contaminación microbiana de los segmentos apicales, estos se lavaron con una solución de detergente comercial al 1.0% (m/v) durante 10 minutos con una agitación continua a 170 rpm. Posteriormente, para la desinfección se estudiaron cuatro concentraciones (1.0, 1.25, 1.5 y 1.75%) de hipoclorito de sodio (NaOCl) (v/v). Los explantes se colocaron en las soluciones de NaOCl por 10 min, posteriormente se transfirieron a etanol al 70% durante 30 s. Por último, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, cada lavado por cinco minutos. Al final del proceso de desinfección, los explantes se colocaron en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con sacarosa 30 g l⁻¹ y agar 7.5 g l⁻¹. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.8 ± 0.02 con Hidróxido de Sodio (NaOH) o Ácido Clorhídrico (HCl), previo a la esterilización mediante autoclave a 127 (kg.cm⁻²) por 22 minutos. El material vegetal se ubicó en un cuarto de crecimiento a 25 ± 2°C, con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad a una intensidad luminosa de 2000 lux, emitida por lámparas de neón de luz blanca.

La distribución del material vegetal se realizó bajo un diseño experimental completamente al

azar (DCA). Se realizaron 20 réplicas para cada tratamiento con un tamaño muestral n=4. Para este diseño se utilizó el modelo estadístico descrito por Gutiérrez *et al.* (2008). A las cuatro semanas de cultivo, se cuantificó el número de explantes necrosados, contaminados, viables (supervivencia) y con mortalidad.

Efecto de la concentración de sales y Bencil Amino Purina (BAP)

Con el objetivo de lograr el establecimiento *in vitro* se realizó un ensayo con dos concentraciones de las sales MS (al 50 y 100% su fuerza iónica) y dos concentraciones de BAP (0.5 y 1.0 mg l⁻¹) para un total de seis tratamientos (Tabla 1). Además, se adicionaron vitaminas MS, sacarosa 30 g l⁻¹ y agar 7.5 g l⁻¹. El ajuste de pH, la esterilización y las condiciones de cultivo en las que se mantuvo el material vegetal coincidieron con las descritas en el experimento anterior.

A las cuatro semanas de cultivo se midió la longitud la yema apical (cm). Basados en las observaciones realizadas en la fase de establecimiento, se desarrolló una escala descriptiva para la evaluación de la brotación y se cuantificó el número de yemas brotadas (apicales y axilares).

Multiplicación *in vitro*

Para multiplicar *in vitro* los brotes de romerillo obtenidos, se añadieron al medio de cultivo diferentes concentraciones de BAP y Ácido Indol Butírico (AIB) para un total de 16 tratamientos con ocho réplicas (Tabla 2). Se partió de brotes con 1 cm de longitud.

Tabla 1. Tratamientos empleados en la fase de establecimiento de segmentos apicales de *Podocarpus oleifolius* D. Don.

Tratamientos	Descripción
T1	MS
T2	MS + 0.5 mg l ⁻¹ BAP
T3	MS + 1 mg l ⁻¹ BAP
T4	MS/2
T5	MS/2 + 0.5 mg l ⁻¹ BAP
T6	MS/2 + 1 mg l ⁻¹ BAP

Tabla 2. Concentraciones de BAP y AIB añadidas al medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Podocarpus oleifolius* D. Don.

Tratamientos	BAP (mg l ⁻¹)	AIB (mg l ⁻¹)
T1	0	0
T2	0	0.4
T3	0	0.6
T4	0	0.8
T5	2	0
T6	2	0.4
T7	2	0.6
T8	2	0.8
T9	3	0
T10	3	0.4
T11	3	0.6
T12	3	0.8
T13	4	0
T14	4	0.4
T15	4	0.6
T16	4	0.8

El medio de cultivo base contenía: sales MS, sacarosa 30 g l⁻¹, carbón activado 0.1 g l⁻¹ y agar 7.5 g l⁻¹. El pH se ajustó a 5.8 ± 0.02 con NaOH o HCl previo a la esterilización en autoclave a 127 (kg cm⁻²) durante 22 minutos. Los cultivos se mantuvieron en cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C, fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad a una intensidad luminosa de 2000 lux, emitida por lámparas de neón de luz blanca. Los explantes se subcultivaron cada cinco semanas y se observó la respuesta de los explantes durante tres subcultivos. Se cuantificó el número de brotes formados explante y se midió la longitud de la yema apical (cm).

Finalmente, para permitir observar la respuesta del explante ante la formulación del medio de cultivo y la acción de los reguladores del crecimiento se calculó la tasa de multiplicación de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$TM = \frac{\text{No. brotes totales}}{\text{Explantes válidos}}$$

Dónde: explantes válidos= explantes vivos *in vitro* sin contar con pérdidas de explantes contaminados y necrosados hasta el final del subcultivo.

Analisis estadístico

Los datos obtenidos de los experimentos se analizaron estadísticamente previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA), mediante la prueba LSD Fisher y en los casos en que no se cumplieron se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento *in vitro*

La concentración de NaOCl influyó en la desinfección de segmentos apicales de romerillo. El incremento de la concentración de este desinfectante disminuyó el porcentaje de explantes contaminados. Sin embargo, los explantes necrosados aumentaron (Figura 2). En el tratamiento de desinfección donde se empleó NaOCl al 1.25% se obtuvo el más alto porcentaje de explantes viables con porcentajes bajos de contaminación microbiana y explantes necrosados (Figura 2), por ello se seleccionó para el establecimiento *in vitro* de esta especie.

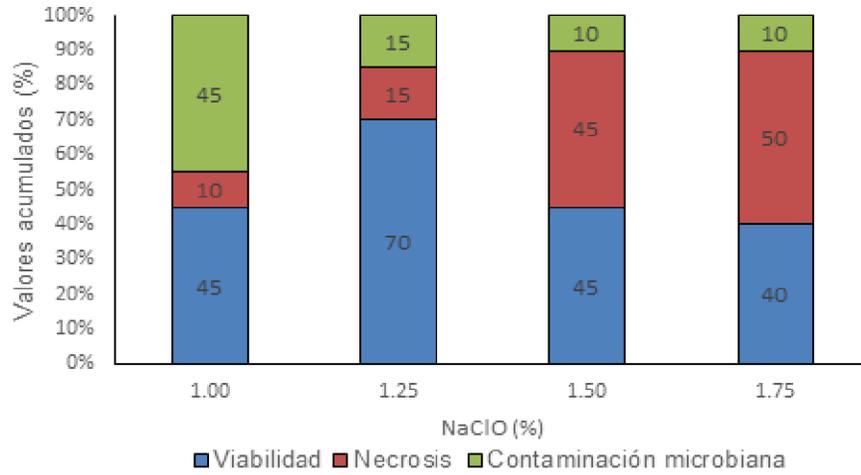


Figura 2. Efecto de las diferentes concentraciones de NaOCl en el establecimiento *in vitro* de *Podocarpus oleifolius*

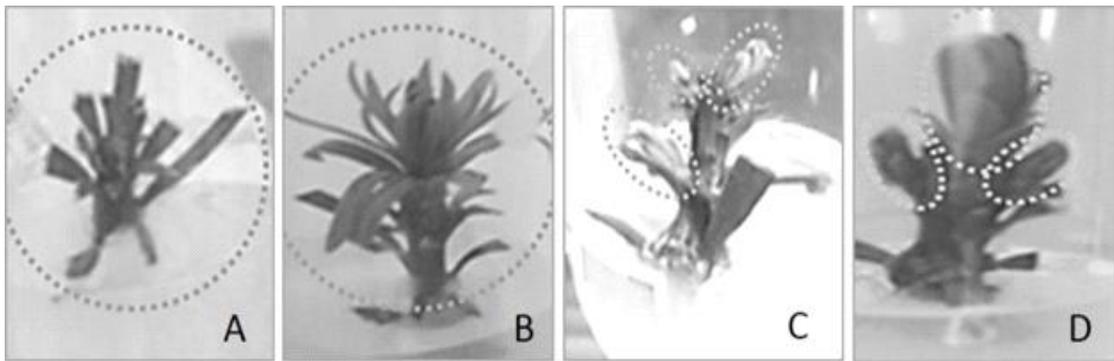


Figura 3. Escala descriptiva para la evaluación de la brotación de segmentos apicales de *Podocarpus oleifolius*. A) grado 1: explante sin brotes, B) grado 2: explante con la yema apical brotada, C) grado 3: explante con yemas axilares brotadas, D) grado 4: explante con la yema apical y yemas axilares brotadas.

El NaOCl se utiliza con frecuencia para la desinfección de tejidos vegetales, debido a que causa la muerte de microorganismos infecciosos como bacterias y hongos exógenos (George *et al.*, 2008), lo que permitió un mayor índice de establecimiento del material vegetal, además de ser efectivo, económico y fácil de adquirir.

Otro agente desinfectante utilizado fue el etanol al 70%, por su eficacia como bactericida, fungicida y viricida (AMEXBIO, 2010). García *et al.* (2008), en su investigación realizada sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (Kunth) Hemsl., utilizaron tratamientos de desinfección con ayuda del etanol al 70% y 80% (v/v), y obtuvieron mejores resultados. En el caso del *Podocarpus oleifolius*, al usar alcohol al 70% en la etapa de pre ensayos, se pudo inhibir los niveles de

contaminación, por lo que en cada uno de los tratamientos de desinfección, se utilizó durante 30 segundos, seguidos de tres lavados consecutivos con agua destilada, pues a mayor tiempo, se pueden necrosar y así provocar pérdida del material vegetal en estudio.

La presencia de contaminación microbiana en todos los tratamientos probados, puso en evidencia que ésta se relacionó con el estado fitosanitario de la planta donante.

La escala descriptiva elaborada contenía cuatro grados dónde: 1-explante sin brotes (Figura 3 A), 2-explante con la yema apical brotada (Figura 3 B), 3-explante con yemas axilares brotadas (Figura 3 C), 4-explante con la yema apical y las yemas axilares brotadas (Figura 3 D).

El medio de cultivo influyó en la brotación de segmentos apicales de romerillo. El mayor porcentaje de yemas brotadas se obtuvo en los explantes cultivados en los medios de cultivo MS y MS/2 (Figura 4). La adición de BAP al medio de cultivo de establecimiento (0.5 y 1.0 mg l⁻¹), independientemente de la concentración de sales, disminuyó hasta un 70% la brotación de las yemas. Solo se observó brotación de yemas axilares en el medio de cultivo que contenía las sales MS al 100% y 1.0 mg l⁻¹ de BAP (tratamiento 3).

Estos resultados abren nuevas interrogantes sobre las condiciones de cultivo necesarias para estimular la brotación *in vitro* de yemas de romerillo y su relación con las concentraciones hormonales endógenas.

La longitud de la yema apical varió en dependencia del medio de cultivo utilizado para el establecimiento de los segmentos apicales. Los explantes cultivados en el medio de cultivo MS sin BAP (tratamiento 1) presentaron los valores más altos con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Figura 5).

El medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento resultó el tratamiento más adecuado para la brotación de yemas apicales y estas alcanzaron una longitud mayor, razón por la cual, fue seleccionado para el establecimiento *in vitro* de segmentos apicales de *P. oleifolius*.

Otros investigadores refieren igualmente resultados satisfactorios en diferentes especies sin la adición de reguladores del crecimiento al medio de cultivo MS. En este sentido, Salazar y Romero (1996), informaron que el medio de cultivo compuesto por las sales MS propició mayores porcentajes de formación de callos de segmentos de hojas de ajonjolí (*Sesamum indicum*). De igual forma, Sudripta *et al.* (1996) y Aliyu y Awopetu (2005), quienes establecieron que la formulación salina del medio de cultivo MS fue la más eficiente para el desarrollo de yemas y regeneración de plántulas en anacardo (*Anacardium occidentale*). También, Ayala (2011), obtuvo mayor brotación en molle (*Schinus molle* L.) utilizando un medio de cultivo MS.

Multiplicación de brotes

Se logró la multiplicación *in vitro* de *Podocarpus oleifolius*, sin embargo, los reguladores del crecimiento BAP y AIB a las concentraciones probadas no aumentaron el número de brotes por explante. Para las variables evaluadas: número de brotes por explante y longitud de la yema apical no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en los subcultivos realizados ($p=0.05$) excepto en el tercer subcultivo en el tratamiento 13 (MS + 4 mg l⁻¹ BAP) que mostró el valor mayor de número de brotes (1.88) y tuvo la tasa de multiplicación más alta en el primer y tercer subcultivo de multiplicación.

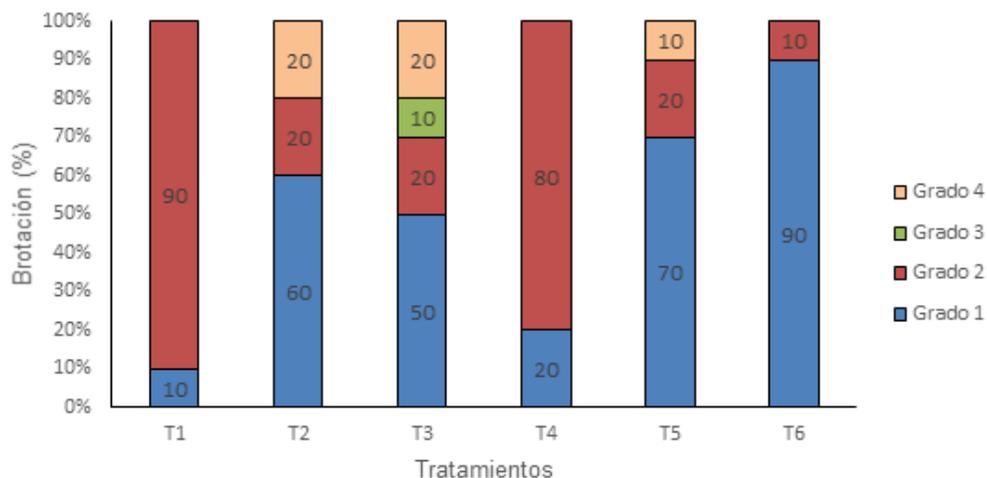
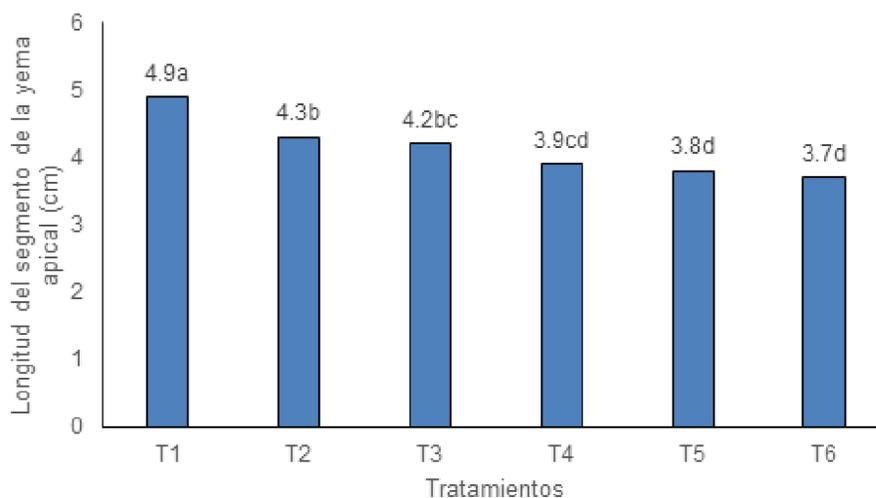


Figura 4. Efecto del medio de cultivo en el establecimiento *in vitro* de *Podocarpus oleifolius* mediante escala descriptiva. Grado 1: explante sin brotes, grado 2: explante con la yema apical brotada, grado 3: explante con yemas axilares brotadas, grado 4: explante con la yema apical y yemas axilares brotadas. T1: MS, T2: MS + 0.5 mg l⁻¹ BAP, T3: MS + 1 mg l⁻¹ BAP, T4 MS/2, T5 MS/2 + 0.5 mg l⁻¹ BAP, T6 MS/2 + 1 mg l⁻¹ BAP.



Medias con letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba LSD Fisher para $p=0.05$

Figura 5. Efecto del medio de cultivo empleado para el establecimiento *in vitro* de *Podocarpus oleifolius* en la longitud de la yema apical. T1: MS, T2: MS + 0.5 mg l⁻¹ BAP, T3: MS + 1 mg l⁻¹ BAP, T4: MS/2, T5 MS/2 + 0.5 mg l⁻¹ BAP, T6 MS/2 + 1 mg l⁻¹ BAP.

Esta influencia entre la variación en las concentraciones de los reguladores de crecimiento y la respuesta de la brotación y longitud concuerda con los resultados de otros autores (Valdés *et al.*, 2004; Shrivastava y Banerjee, 2008) quienes plantearon que para la inducción y crecimiento de los brotes se obtienen diferentes respuestas frente a distintos tipos de reguladores del crecimiento y concentraciones.

En general, se formaron de uno a tres brotes por explante y las yemas apicales tenían entre 0.8 y 2.4 cm de longitud. Los resultados indicaron una disminución de la tasa de multiplicación, del número brotes por explante, del primer al segundo subcultivo.

El número de subcultivos y composición del medio de cultivo, pudieron afectar la estabilidad genética y la tasa de multiplicación de las plantas (Hartmann y Kester, 1997). Esta declinación progresiva de la organogénesis pudo deberse a dos hechos, el primero establece que los cambios genéticos producidos en el cultivo *in vitro*, principalmente poliploidía y aneuploidía, afectaron la competencia organogénica de los explantes y el segundo hace relación al agotamiento fisiológico de los explantes debido a factores

endógenos hormonales y tróficos, pues las células al envejecer en cultivo, aumenta la probabilidad de sinterizar productos nocivos para el crecimiento (Gómez *et al.*, 2007).

No obstante, se requieren otros estudios para validar estas hipótesis y ensayar con otros reguladores del crecimiento con el fin de aumentar el número de brotes por explante y su longitud, así como lograr su enraizamiento. Este trabajo sirve como pauta para la implementación de un sistema de propagación a gran escala de *P. oleifolius*.

CONCLUSIONES

Se logró el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de *P. oleifolius* vía organogénesis directa a partir de segmentos apicales de árboles jóvenes cultivados en campo lo cual sienta las bases para la propagación masiva de esta especie de importancia económica y ambiental para Ecuador.

REFERENCIAS

Aliyu O, Awopetu J (2005) *In vitro* regeneration of hybrid plantlets of cashew (*Anacardium occidentale* L.) through embryo culture. African Journal of Biotechnology 4(1): 548-553

- AMEXBIO (2010) Asociación Mexicana de bioseguridad. [En línea] En: <http://seguridadbiologica.blogspot.com/p/asociacion-mexicana-debioseguridad-ac.html>. Consultado el 04 de enero del 2013
- Ayala A (2011) Establecimiento de cultivo *in vitro* de molle (*Schinus molle* L.) a partir de yemas axilares tomadas de plantas madre como una herramienta para la propagación de la especie. Unidad de Espacio Público EPMMOP. Quito. [En línea] En: <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/4734>. Consultado el 01 de Enero del 2013
- Borja C, Lasso S (1990) Plantas nativas para la reforestación en el Ecuador. EDUNAI – AID. Quito
- Cortés A, Chamorro C, Vega A (1990) Cambios en el suelo por la implantación de praderas, coníferas y eucaliptos en un área aledaña al Embalse de Neusa (Páramo de Guerrero). Subdirección Agrológica de Investigaciones. IGAC. Bogotá
- Frank D, Finckh M (2009) Impactos de las plantaciones de Pino Oregón sobre la vegetación y el suelo en la zona centro sur de Chile. Historia Natural Chilena, HNT. Santiago de Chile
- García F, Alvarez A, Rodríguez G, Corona L (2008) Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. Foresta Veracruzana 10 (2): 23-27
- George E F, Hall M A, De Klerk G (2008) Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition. Springer. Dordrecht
- Grez R (1998) Nódulos radiculares en coníferas chilenas. Instituto de Silvicultura, UACH. Santiago de Chile
- Gutiérrez H, De La Vara R, Cano A, Osorio M (2008) Análisis y diseño de experimentos (2° edición). Mc Graw-Hill. México DF
- Hartmann H, Kester D (1997) Propagación de plantas. Capítulo 16. Principios de Cultivo de Tejidos para la Micropropagación. Compañía Editorial Continental S.A. México D. F.
- Jara L, Ordoñez G (2000) Manejo de semillas y viveros forestales. DMQ. Quito
- Lojan L (1992) El verdor de los Andes. Árboles y arbustos nativos para el desarrollo forestal alto andino. Proyecto forestal participativo en los andes. UNT. Texas
- Reporter G (2008) *Parque Nacional Podocarpus*. UNL. [En línea] En: <http://www.global-reporter.net/spamosch/themen/podocarpus.html>. Consultado el 17 de Febrero del 2013
- Salazar E, Romero C (1996) Cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). Departamento de Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Venezuela. Instituto Universitario de Tecnología del Yaracuy. San Felipe
- Shrivastava S, Banerjee M (2008) *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.). A Journal for Biology Beyond Borders 15(2): 7-11
- Sudripta D, Timir B, Simuta J (1996) *In vitro* propagation of cashewnut. Plant Cell Tissue and Organ Culture 31(2): 615-619
- Valdés A, Centeno L, Fernández B (2004) Age-related changes in the hormonal status of *Pinus radiata* needle fascicle meristems. American Society and Plant Physiology 141(2): 919-962

Recibido: 30-01-2014
Aceptado: 26-08-2014